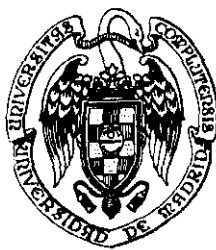


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**Dpto. de BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR I**



* 5 3 0 9 8 8 6 6 6 X *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

618127885
12477109

**ESTUDIO DE LAS RELACIONES ESTRUCTURA-
FUNCIÓN EN TOXINAS PROTEICAS DE *Aspergillus*:
SECRECIÓN Y ACTIVIDAD RIBONUCLEOLÍTICA**

ANTONIO MARTÍNEZ RUIZ

Madrid, 2000

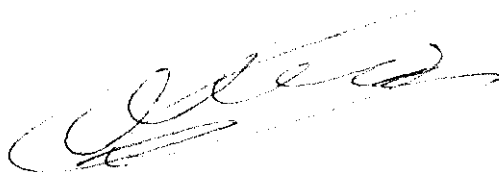
Portada: Modelos en cinta de las estructuras de la α -sarcina y de la RNasa U2, según las referencias citadas en el texto.

Contraportada: Modelo en cinta de la estructura de la AFP, según la referencia citada en el texto.

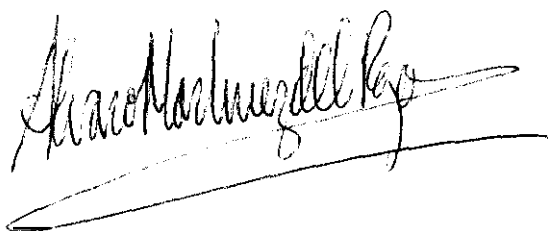
Memoria que, para optar al título de «Doctor por la Universidad Complutense (Programa de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias Químicas)», presenta D. Antonio Martínez Ruiz.

La presente investigación ha sido realizada en dicho Departamento, bajo la dirección del Dr. Álvaro Martínez del Pozo.

El interesado,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio Martínez Ruiz', with a long horizontal flourish extending to the right.

El director,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Álvaro Martínez del Pozo', with a long horizontal flourish extending to the right.

GRACIAS

Ahora que ya parece que va a ver la luz esta Tesis y, a la vez, acaba un periodo de mi vida, es hora de recapitular, profesional y personalmente, y lo primero que me surge es la impresión de que, aunque sea yo quien firme esta Memoria, este ha sido un trabajo colectivo (esa es la primera enseñanza recibida: la ciencia, como la vida, no se hace sino en comunidad).

A las primeras personas que hay que agradecer el trabajo científico es a las de mi grupo de investigación. Porque, aunque no seamos todo lo «grupo» que a mí me gustaría, sí que se nota en este trabajo que han dejado su huella. Vayamos por orden. A Pepe (el Dr. José G. Gavilanes), por ser modelo de dirección discreta y generadora de libertad, además de por su gran profundidad humana. A Mercedes, por su ayuda y evaluación, también en la docencia. A Josemi (el Dr. José Miguel Mancheño), por ser ejemplo de trabajo y cordialidad. A Javier (el Dr. Lacadena), que siempre tendrá la culpa de que yo viniera por aquí, y con el que compartía tantas cosas hasta que se exilió. A Vivian (la Dra. De los Ríos), por ser tan «amolosa» con todos; algún día te devolverán tanto amor. A Carmen (Lda. De Antonio), que nos ha aportado un toque «exótico». A Valle (Lda. Lacadena), que ha continuado la tradición de una familia que me ha sido cercana en muchos momentos, pero también por ser ella misma. A Lucía (Lda. García Ortega), que en poco tiempo ha sabido encontrar mis puntos débiles, pero también los de los demás; tú vales mucho (es para animar con lo que te dejo). Y también agradezco a los que estuvieron brevemente: Jérémie (Ldo. Wirth) y Chapin (Ldo. Rodríguez), que nos enseñaron el valor de la originalidad. Todos ellos han sido compañeros/as de vida, pero algunos han estado haciendo también parte del trabajo aquí recogido. Ellos ya lo saben.

Este trabajo tampoco se podría haber hecho sin las personas que forman el grupo humano y profesional del llamado «eletrés». Paco (Dr. Francisco Gavilanes), que tanto se ocupa de los análisis de aminoácidos, de los aparatos, y de mantener el buen humor a pesar de los pesares. Rosalía (Dra. Rodríguez) y Juanma (Dr. García Segura) por sus discusiones siempre llenas de sabiduría. «Ertunái» (Dr. Javier Turnay), por sus continuos desvelos para que los ordenadores no sólo funcionen, sino que estén a la última. Nacho, Evagé, Mayte, por enseñarme nuevos valores de la amistad. Y, aunque me gustaría detallar más, agradezco a Belén, Isabel, Julián, Amalia, Sonia, Elena, etc., tantas horas en buena compañía.

En este tiempo también he aprendido la importancia del trabajo en colaboración, para recoger frutos mayores aportando cada uno distintas cosas a la planta.

En primer lugar, al Grupo de RMN del Instituto de Estructura de la Materia (CSIC), porque ha sido la colaboración más larga, intensa, y con mayor fruto, tanto en la ciencia como en lo personal. A José Manuel (Dr. Pérez Cañadillas), por transmitirnos parte del profundo conocimiento que ha adquirido de todos los detalles de nuestra querida α -sarcina, y ayudarnos a comprendela mejor. A Ramón (Dr. Campos Olivas), porque su insistencia nos ha hecho trabajar duro. A Marta (Dra. Bruix), por su cariño «maternal». A Douglas (Dr. Laurents), un auténtico tejano español, y a Manolo (Dr. Rico), que aporta la sabiduría de la experiencia.

The second deep collaboration has been with potential competitors in the University of British Columbia (Vancouver, Canada), which is also a good lesson. To Julian (Dr. Davies) for his deep wisdom and knowledge of science, which gives away to people around him. To Richard (Dr. Kao) for teaching me to work together above cultural differences. And to other persons in Davies' lab, for integrate me in a new lab.

Y también hay que destacar otras colaboraciones que, si no son tan generales, sí han sido fundamentales para muchos aspectos recogidos en esta Tesis. Belén (Dra. Patiño) y «Covi» (Dra. Covadonga Vázquez) del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología han hecho los ensayos de actividad antifúngica. Drs. Barbara Dill and James Kronstad helped me withwith their knowledge about fungi in Vancouver. Para fermentar la levadura, me ayudaron los Drs. Humberto Martín y María Molina, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia. Y Rocío (Lda. Martínez Ruiz, aunque sea «doctora» me ha ayudado a relacionar los *Aspergilli* con las enfermedades humanas. Entre tantos microbiólogos han conseguido enseñarme a quere un poco a los hongos.

El Dr. Carlos López Otín, de la Universidad de Oviedo, ha hecho las secuencias de aminoácidos. Y Rosa y Maribel, del Centro de Secuenciación de DNA de la UCM, nos han hecho mucho más fácil secuenciar el DNA, sobre todo porque da gusto tratar con ellas. El Dr. Fernando Vivanco, de este Departamento, nos ha proporcionado desde la Clínica de la Concepción (Fundación Jiménez Díaz) estupendos anticuerpos frente a la α -sarcina y a la AFP (además de tarta de trucha). Nuria (Lda. Peña) y Julio (Dr. Reviejo) me enseñaron que se podía medir muy fácilmente la concentración de metanol, para no emborrachar a la Pichia.

Otras personas más han colaborado directamente en la redacción de la Tesis: Paloma (Dra. Martínez Ruiz), con el esquema químico; Alberto (Dr. García Martínez) con el ordenador, y Anabel (simplemente ella) dándome ánimo, quizá a costa de perderlo ella. Y otras lo han hecho de forma más indirecta, ayudándome a mí a vivir mejor durante este tiempo. Pero no quiero enrollarme más, así que ya se lo contaré a ellas.

Me queda sólo hablar de Álvaro (Dr. Martínez del Pozo) que, como el apellido indica, ha sido mi padre científico (eso sí, he podido mantener mi nombre propio de hijo, no como otros). O sea, que sin él no sería como soy ahora, ni para lo bueno ni para lo malo. Ya me daré cuenta ahora, que me voy de casa...

ÍNDICE

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS	xiii
RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	1
Las ribonucleasas microbianas extracelulares	1
La ribonucleasa U2	5
El mecanismo catalítico de las ribonucleasas microbianas	10
Las ribotoxinas fúngicas	12
El descubrimiento de las ribotoxinas	14
Su actividad ribonucleolítica altamente específica	15
Citotoxicidad	22
La entrada en las células: interacción con membranas	23
Producción de ribotoxinas recombinantes	27
Modelización y determinación de su estructura	31
La producción de proteínas heterólogas en <i>Pichia pastoris</i>	36
OBJETIVOS	41
MATERIALES	43
1.- Microorganismos	43
Cepas de <i>Escherichia coli</i>	43
Cepas para la manipulación del DNA	43
Cepas para la expresión de genes plasmídicos	43
Cepas para mutagénesis dirigida por oligonucleótido	43
Cepas de <i>Pichia pastoris</i>	44
Hongos filamentosos	44
Producción de α -sarcina y AFP	44
Detección de ribotoxinas	44
Cepas de <i>Ustilago</i>	44
2.- Vectores plasmídicos	45
Vectores para la manipulación del DNA	45
Vectores para la producción de proteínas en <i>E. coli</i>	47
Vectores para la producción de proteínas en <i>P. pastoris</i>	48
3.- Medios de cultivo	49
Cultivo de <i>E. coli</i>	49
Cultivo de <i>P. pastoris</i>	50
Crecimiento y selección de recombinantes	50
Producción de proteínas	51
Fermentación	52
Cultivo de hongos filamentosos	52
Cultivo de <i>Ustilago spheurogena</i>	53
4.- Soluciones de uso general	53
MÉTODOS	55
1.- Conservación de cepas	55
Hongos filamentosos	55

<i>E. coli</i>	55
<i>P. pastoris</i>	55
<i>U. sphaerogena</i>	55
2.- Aislamiento de DNA genómico	56
De hongos filamentosos	56
De <i>Pichia pastoris</i>	56
De <i>Ustilago sphaerogena</i>	57
3.- Aislamiento de RNA	58
De <i>U. sphaerogena</i>	58
4.- Reacciones de amplificación por PCR	59
Detección de ribotoxinas	59
Obtención del gen y cDNA de la RNasa U2	60
5.- Electroforesis de ácidos nucleicos	62
Electroforesis de DNA	62
Electroforesis en geles de agarosa	62
Electroforesis en geles de poliacrilamida	62
6.- Manipulación de DNA	62
Aislamiento de plásmidos de <i>E. coli</i>	62
Aislamiento de fragmentos de DNA	63
Purificación de fragmentos de DNA de gran tamaño	63
Purificación de fragmentos de DNA de pequeño tamaño	64
Purificación de fragmentos de DNA amplificados por PCR	64
Reacciones de modificación de DNA	65
Endonucleasas de restricción	65
Ligación de fragmentos de DNA	65
Reacción con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa	65
Secuenciación de DNA	66
Secuenciación automática	66
Mutagénesis dirigida	66
Purificación de DNA de cadena simple (ssDNA)	66
Mutagénesis con DNA plasmídico enriquecido en uridina (método de Kunkel)	67
7.- Transformación de células y selección de recombinantes	68
Transformación de <i>E. coli</i>	68
Preparación de células competentes	68
Transformación de células de <i>E. coli</i>	69
Selección de colonias	69
Selección por color	69
Selección por tamaño del plásmido («minis de colonias»)	69
Transformación de <i>P. pastoris</i>	70
Transformación por cloruro de litio	70
Transformación por acetato de litio	70
Transformación por electroporación	71
Transformación por PEG, congelando células competentes	72
Selección de recombinantes en el locus de <i>AOX1</i> de <i>P. pastoris</i>	73
Selección de cepas productoras de ribonucleasa extracelular (actividad frente a RNA, en placa de cultivo)	74
Expresión piloto de proteínas en <i>P. pastoris</i> por secreción extracelular	76

Expresión piloto de α -sarcina intracelular en <i>P. pastoris</i>	77
8.- Producción y purificación de proteínas	78
Ensayo de producción de ribotoxinas en cepas de <i>Aspergilli</i>	78
Producción y purificación de α -sarcina y AFP de <i>Aspergillus giganteus</i>	79
Producción y purificación de RNasa U2 de <i>Ustilago sphaerogena</i>	79
Producción y purificación de α -sarcina y sus mutantes en <i>Escherichia coli</i>	80
Vector de expresión pINPGaS	80
Vector de expresión pET11baS	81
Producción y purificación de α -sarcina en <i>Pichia pastoris</i>	82
Producción de RNasa U2 en <i>Escherichia coli</i>	82
Producción y purificación de RNasa U2 en <i>Pichia pastoris</i>	83
Fermentación	83
9.- Caracterización de las proteínas purificadas	84
Espectros de absorción en la región UV-visible	84
Espectros de diroísmo circular	85
Espectros de fluorescencia	85
Análisis de aminoácidos	86
Secuenciación automática	86
Electroforesis en geles de poliacrilamida	86
Inmunodetección de α -sarcina y AFP	87
Detección de proteínas glicosiladas	88
Reducción y carboxiamidometilación	88
Digestión con proteasas	89
HPLC en fase inversa	89
Determinación de la masa molecular por cromatografía de penetrabilidad	90
Programas bioinformáticos utilizados	90
10.- Ensayos de actividad antifúngica	91
11.- Ensayos de actividad ribonucleolítica	91
Actividad frente a ribosomas	93
Adaptación para esporas de hongos	93
Zimograma frente a homopolinucleotidos	94
Procedimiento	96
Actividad frente a RNA de levadura	96
Procedimiento	97
Unidades de actividad	97
Preparación del sustrato	98
Actividad frente a dinucleotidos	99
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
A - Detección y caracterización de nuevas ribotoxinas	103
La hirsutelina A, ¿un intermedio evolutivo?	113
B - Mecanismo de producción y secreción	116
Clonación y producción de α -sarcina en <i>Pichia pastoris</i>	116
La secuencia señal de <i>Aspergillus</i> es reconocida en <i>Pichia</i>	122
El procesamiento del precursor de la α -sarcina se da en varios pasos	

.....	123
La especificidad de la proproteína convertasa de <i>Pichia pastoris</i>	126
Se ha caracterizado una pro- α -sarcina activa: la protección frente a la toxina depende de la translocación efectiva al retículo endoplásmico	129
Producción de otra proteína extracelular por <i>Aspergillus giganteus</i> , la proteína antifúngica (AFP)	130
La AFP representa un nuevo grupo de péptidos antifúngicos	134
Caracterización de las dos formas extracelulares de la proteína antifúngica	136
La especificidad de la proproteína convertasa de <i>Aspergillus</i>	144
C - Actividad ribonucleolítica	146
La α -sarcina es una ribonucleasa ciclante	146
La α -sarcina es una ribonucleasa ácida	150
La His 137 y el Glu 96 son los residuos que catalizan la reacción ácido-base	153
D - Clonación y producción heteróloga de la ribonucleasa U2	158
Obtención del gen	159
Estrategias de producción en <i>Escherichia coli</i>	161
Secreción al periplasma (estrategia pINOU2)	161
Secreción al medio extracelular (estrategia pINGU2)	163
Producción en <i>Escherichia coli</i>	164
Estrategias de producción en <i>Pichia pastoris</i>	165
Estrategia pPICU2	165
Estrategia pHSU2	167
Producción en <i>Pichia pastoris</i>	169
Producción en medio semimínimo	169
Producción en medio mínimo tamponado	170
Fermentación	171
Purificación de la RNasa U2 natural de <i>Ustilago sphaerogena</i>	172
Caracterización de la proteínas nativa y recombinante	173
La proteína nativa y recombinante pueden tener distinto patrón de puentes disulfuro	180
CONCLUSIONES	183
BIBLIOGRAFÍA	187
ANEXO	217

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

Se recogen aquí abreviaturas, siglas y símbolos utilizados en la Tesis y que no están recogidos por autoridades científicas o por la Real Academia Española (1999). No se incluyen los nombres de géneros taxonómicos, genes, cepas de microorganismos, plásmidos o proteínas mutantes, que ya se explican en el texto, ni nombres exclusivamente comerciales.

2'-AMP	2'-monofosfato de adenosina
3'-AMP	3'-monofosfato de adenosina
A _n	absorbancia a la longitud de onda n (nm)
ACE _T	<i>testicular angiotensin-converting enzyme</i> , enzima testicular conversora de angiotensina
AcO	ion acetato, usado como símbolo químico en formulación
AFP	proteína antifúngica
Anafp	proteína antifúngica de <i>Aspergillus niger</i>
ApA	adenilil(3' → 5')adenosina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> , colección de cultivos estadounidense
ATP	5'-trifosfato de adenosina
BSA	albúmina de suero bovino
2',3'-cAMP	2',3'-monofosfato cíclico de adenosina
CBS	<i>Centraalbureau voor Schimmelcultures</i> , colección de cultivos holandesa
CI	solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
CD	dicroísmo circular
cfu	unidades formadoras de colonias
2',3'-cGMP	2',3'-monofosfato cíclico de guanosina
cont.	continuación
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
ddNTP	5'-trifosfato de 2',3'-didesoxinucleótido (de cualquiera de las bases del DNA)
DEAE	dietilaminoetil(o)
DEPC	dietilpirocarbonato
DMPC	dimiristoilfosfadilcolina
DMPG	dimiristoilfosfadilglicerol
DMPS	dimiristoilfosfadilserina
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	5'-trifosfato de 2'-desoxinucleótido (de cualquiera de las bases del DNA)
DPAP	dipeptidil aminopeptidasa
DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DSC	calorimetría diferencial de barrido
DTT	DL-ditiotreitol
E ^{0,1%}	coeficiente de extinción al 0,1% (p/v)
EC	comisión de enzimas; indica la nomenclatura de la clasificación enzimática
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético

FPLC	cromatografía líquida rápida para proteínas
g	en centrifugación, la aceleración del campo gravitatorio terrestre
2'-GMP	2'-monofosfato de guanosina
3'-GMP	3'-monofosfato de guanosina
GpA	guanilil(3' → 5')adenosina
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HEPES	N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfónico]
IPTG	β-D-tiogalactopiranosido de isopropilo
kb	kilopar(es) de bases de DNA
k_{cat}	constante catalítica
K_M	constante de Michaelis
If-AFP	forma mayor de la AFP
MIC	concentración inhibitoria mínima
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MU	medio <i>Ustilago</i>
OD _n	dispersión óptica a la longitud de onda n (nm)
p/v	peso/volumen
PAF	proteína antifúngica de <i>Penicillium chrysogenum</i>
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PAGE-SDS	PAGE en presencia de SDS
pb	par(es) de bases de DNA
PC	fosfatidilcolina
PCI	solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1)
PCR	reacción(es) en cadena de la polimerasa
PDA	agar de patata y dextrosa
PDB	caldo de patata y dextrosa
PDB	base de datos de estructuras de proteínas, <i>Protein Data Bank</i>
PE	fosfatidiletanolamina
PEG	polietilenglicol
PG	fosfatidilglicerol
PMSF	fluoruro de fenilmetanosulfonilo
poli(A)	ácido poliadenílico
poli(G)	ácido poliguanílico
poli(I)	ácido polinosínico
PS	fosfatidilserina
RC-AFP	AFP reducida y carboxiamidometilada
RIP	proteína(s) inactivante(s) de ribosomas
RMN	resonancia magnética nuclear
RNasa, RNasas	ribonucleasa(s)
RP-HPLC	HPLC en fase inversa
rpm	revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosomal
SDS	dodecilsulfato de sodio
SM	esfingomielina
sp.	especie sin determinar de un género taxonómico
spp.	especies varias de un género taxonómico
SRL	lazo de sarcina/ricina
ssDNA	DNA de cadena simple
ssDNA-U	DNA de cadena simple enriquecido en uracilo
TAE	tampón Tris-acetato 0,045 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0

TBE	tampón Tris-borato 0,045 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0
TE	tampón Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH entre 7,4 y 8,0
TFA	ácido trifluoroacético
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UBC	<i>University of British Columbia</i>
UV	ultravioleta
v/v	volumen/volumen
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
YMA	agar de morfología de levaduras
YNB	base nitrogenada para levaduras
ϵ_0	coeficiente de extinción molar (absorbancia) a la longitud de onda λ
Θ_{MRW}	elipticidad molar por residuo de aminoácido

RESUMEN

La α -sarcina es la más conocida de la familia de las ribotoxinas fúngicas, proteínas citotóxicas secretadas por hongos filamentosos, que presentan una exquisita especificidad de sustrato por un solo enlace del ribosoma, a la vez que la capacidad intrínseca de atravesar membranas celulares. Son proteínas que se habrían especializado por evolución a partir de un gen de la familia de las ribonucleasas microbianas extracelulares, menos específicas y no citotóxicas, como la ribonucleasa T1. Se ha estudiado la presencia de ribotoxinas en varios hongos del género *Aspergillus* y otros relacionados, concluyéndose que la ribotoxinas están más extendidas entre los hongos filamentosos de lo que se creía hasta ahora. También se ha estudiado la relación filogenética entre ellas. Asimismo, se ha encontrado un posible intermedio evolutivo en la hirsutelina A, al comparar su estructura primaria. Se han estudiado los mecanismos de producción y secreción de toxinas en *Aspergillus*, tanto en el propio hongo, *A. giganteus*, como en la levadura *Pichia pastoris*, tomando como modelos la α -sarcina y otra proteína citotóxica, la llamada proteína antifúngica (AFP), que se ha caracterizado en detalle. Se han dilucidado los pasos que se dan en el procesamiento proteolítico de los precursores, estudiando más en detalle la eficiencia de la secuencia señal y la especificidad del corte por la proproteína convertasa homóloga a la kexina (Kex2p). Se ha estudiado el mecanismo catalítico de la α -sarcina, estableciéndose que es una ribonucleasa ciclante ácida, y los papeles que ejercen los residuos catalíticos en la transfosforilación: la His 137 es el ácido general, y el Glu 96 la base general. Asimismo, se han conseguido sistemas de producción recombinante, en *Escherichia coli* y en *P. pastoris*, tanto para la α -sarcina como para la ribonucleasa U2. Esta última es la ribonucleasa no citotóxica más parecida a las ribotoxinas y servirá de punto de partida para establecer el papel de las zonas añadidas a las ribotoxinas durante la evolución, que le conferirían las actividades especiales que tienen.

INTRODUCCIÓN

Las ribonucleasas microbianas extracelulares

Hay un grupo de ribonucleasas extracelulares, producidas por microbios, que han sido estudiadas ampliamente y que forman una familia de proteínas homólogas (Hill et al., 1983; tabla T004). La ribonucleasa T1 es la mejor caracterizada de entre todas ellas, ya que se ha estudiado en profundidad desde hace bastantes años, con distintos enfoques. La produce el hongo *Aspergillus oryzae*, y es una proteína ácida, pequeña (104 aminoácidos; Takahashi, 1985) y con dos puentes disulfuro. Su estructura se conoce en detalle gracias a estudios de difracción de rayos X, y consiste en una pequeña horquilla β en el extremo amino, una lámina β antiparalela, en la cual está situado el centro activo, y una hélice α enfrentada a la cara contraria de la lámina (véase la figura 3 más adelante; revisado en Steyaert, 1997; Hahn y Heinemann, 1994; Irie, 1997). Tiene una alta especificidad para romper RNA de cadena simple tras residuos de guanina y su mecanismo de acción, ampliamente estudiado, consiste en dos etapas: una transfosforilación que produce un 2':3'-ciclofosfato, y su hidrólisis para dejar el fosfato unido por 3' al residuo de guanosina (véase la figura 4 más adelante). Estas reacciones se dan mediante la utilización de residuos susceptibles de ionización como ácidos y bases generales. Concretamente, se han identificado estos residuos, que son His 40, Glu 58 e His 92, aunque «ayudados» por otros elementos de la estructura (revisado en Steyaert, 1997; Hahn y Heinemann, 1994; Irie, 1997). Este mecanismo catalítico, denominado de «ribonucleasas ciclantes», es el mismo que utilizan las otras ribonucleasas microbianas extracelulares, así como otra gran familia de ribonucleasas de mamíferos, representadas por la RNasa A. También se ha estudiado en detalle su plegamiento y estabilidad, obteniéndose conclusiones generales sobre el plegamiento de proteínas globulares (Pace, 1990; Pace et al., 1991; Hahn y Heinemann, 1994).

Se puede hablar, por tanto, de la gran familia de las RNasas de tipo T1, dentro de la cual existen, a su vez, distintas subfamilias. El primer tipo es producido por organismos procariotas, de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*. La proteína más característica de este grupo es la barnasa (Hartley, 1997), o ribonucleasa Ba, producida por la cepa H de *Bacillus amyloliquefaciens*. Se han detectado otras ribonucleasas muy parecidas (con menos de tres sustituciones) en otras cepas de *Bacillus*, así como otra proteína, llamada binasa, de *B. intermedius*, con la que mantienen un 85% de identidad de secuencia, y que tiene a su vez homólogos muy similares en otras cepas. En *Streptomyces* hay

Tabla 1: RNasas microbianas extracelulares de la superfamilia de la T1 cuya secuencia se conoce (la referencia es de las bases de datos SwissProt, EMBL o PIR), con algunas de sus características. No se incluye a las ribotoxinas. «n° aa»: longitud de la secuencia en aminoácidos.

RNasa	Organismo	Referencia secuencia (n° acceso)	Especi- ficidad	n° aa	puentes disulfuro
Bacillus					
Binasa (Bi)	<i>Bacillus intermedius</i>	P00649	G	113	0
Bp	<i>Bacillus pumilus</i>	P48068	G	109	0
Bco	<i>Bacillus coagulans</i>	P37203	G	109	0
Barnasa (Ba)	<i>Bacillus amyloquefaciens</i>	P00648	G	123	0
Bci	<i>Bacillus circulans</i>	P35078	G	110	0
Streptomicetos					
Sa	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	P05798	G	96	1
Sa3	<i>Streptomyces aureofaciens</i> CCM3239	P30289	G	98	1
Sa2	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Q53752	G	96	1
St	<i>Streptomyces erythraeus</i>	P00650	G	101	1
Hongos ascomicetos					
Pch1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	P09647	G	102	2
Pb1	<i>Penicillium brevicompactum</i>	P07446	G	102	2
Ms	<i>Aspergillus saitoi</i>	P00653	G	105	2
C2	<i>Aspergillus clavatus</i>	P00652	G	104	2
Ap1	<i>Aspergillus palidus</i>	226367	G	104	2
T1	<i>Aspergillus oryzae</i>	P00651	G	104	2
N1	<i>Neurospora crassa</i>	P09646	G	104	2
F1	<i>Fusarium moniliforme</i>	P10282	G	106	2
F11	<i>Fusarium lateritium</i>	P16411	G	105	2
F12	<i>Fusarium lateritium</i>	P16412	G	105	2
Th1	<i>Trichoderma harzianum</i>	P26875	G	106	2
Hongos basidiomicetos					
U1	<i>Ustilago sphaerogena</i>	P07736	G	105	2
Pol	<i>Pleurotus ostreatus</i>	AAB32829.1	G	101	3
U2	<i>Ustilago sphaerogena</i>	P00654	G, A	114	3

otro grupo de ribonucleasas extracelulares, similares entre sí, y que presentan un 20 o 25% de identidad con la barnasa, pero que mantienen el mismo motivo de plegamiento y actividad. Se conocen cuatro secuencias de este género, denominadas ribonucleasas Sa (Shlyapnikov et al., 1986), Sa2 y Sa3 (Homerova et al., 1992), producidas por distintas cepas de *S. aureofaciens*, y la St, producida por una cepa de *S. erythraeus* (Nakamura et al., 1982). Estas ribonucleasas de *Streptomyces* tienen entre ellas identidades de secuencia entre el 49 y el 69%, y son más parecidas a la familia de la T1 que a la de la barnasa,

por lo que se las podría considerar un puente entre los grupos eucariota y procariota.

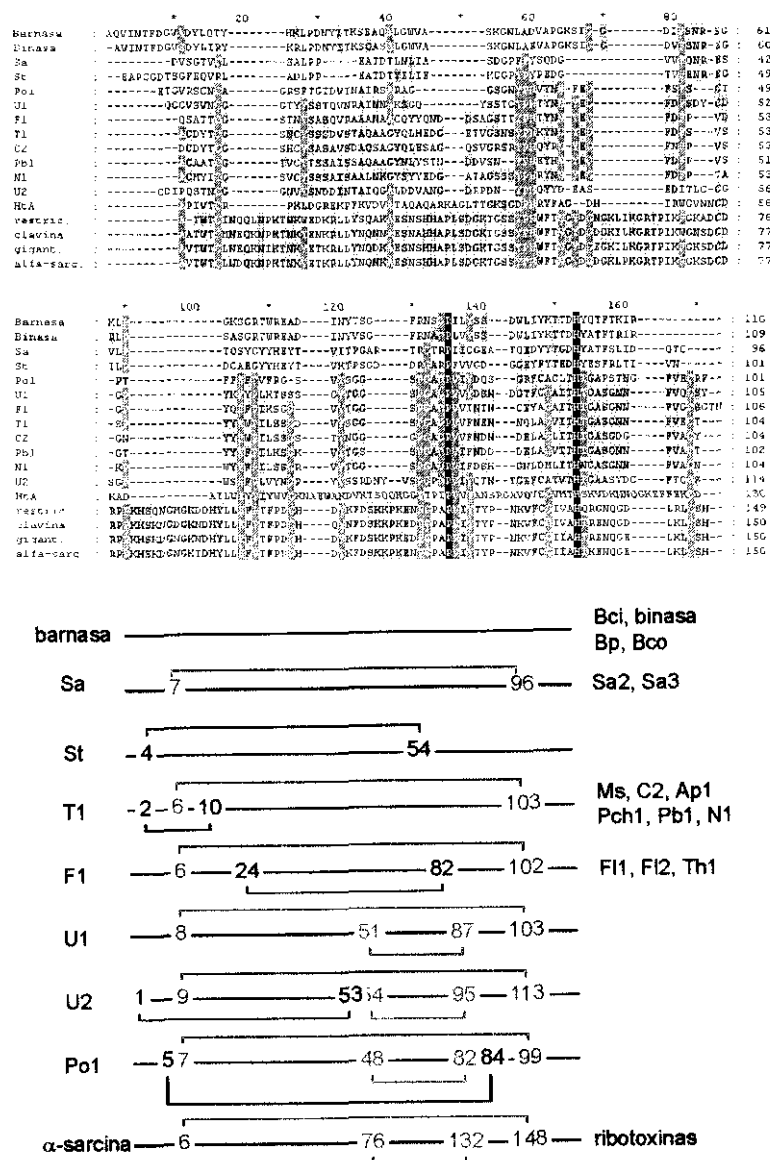


Figura 1: Comparación de las RNAsas microbianas extracelulares de la superfamilia de la T1. A: Alineamiento de las secuencias primarias de las RNAsas más representativas. Las referencias están en la tabla 1. Los niveles de sombra indican la identidad de residuos entre al menos 4, 8, o todas las secuencias. B: Topología de puentes disulfuro, indicando el número de residuo de las cisteínas implicadas en cada una de las proteínas enumeradas a la izquierda; a la derecha se indican las RNAsas que comparten el mismo patrón de puentes disulfuro.

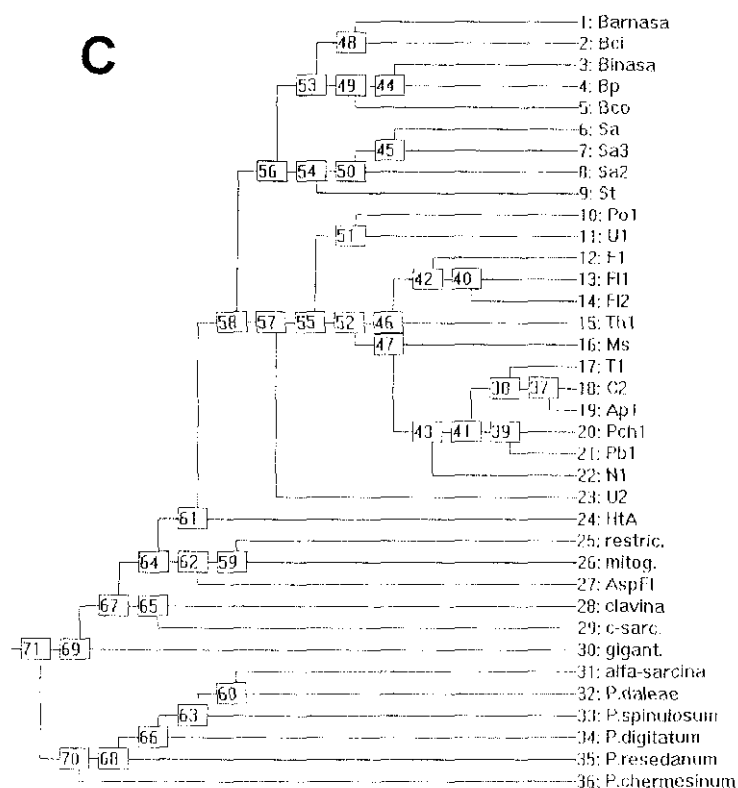


Figura 1 (cont.): C: Árbol filogenético de las RNasas microbianas, indicando las distancias entre ellas.

El segundo gran tipo de ribonucleasas microbianas extracelulares es el de las producidas por microorganismos eucariotas. Los organismos productores que se conocen son todos hongos filamentosos, pertenecientes a distintas clases y géneros. Entre ellos, hay algún basidiomiceto, como *Ustilago sphaerogena*, que produce las RNasas U1 y U2, y *Pleurotus ostreatus*, que produce la Po1, siendo los demás ascomicetos (tabla 1). Una primera clasificación estructural divide a las proteínas de esta subfamilia en cinco grupos, según la disposición de los puentes disulfuro presentes (figura 1; Irie, 1997). La disposición más frecuente es la de la ribonucleasa T1, que tiene dos puentes disulfuro, entre los residuos 2 y 10 y entre el 6 y el 103. Este último puente está conservado en todas las demás ribonucleasas de eucariotas. Otro grupo incluye las RNasas F1 y Th1, que tienen el segundo puente entre los residuos 24 y 84 (según la numeración de la T1). El tercer grupo es el de la RNasa U1, cuyo segundo puente está entre los residuos 51 y 87. La RNasa U2 formaría otro grupo, pues tiene tres puentes disulfuro, dos de ellos homólogos a los de la U1. Por último,

otro grupo es el de la RNasa Po1, que tiene tres puentes, uno homólogo a uno de la T1, otro a uno de la U2, y otro distinto (figura 1).

No se ha publicado que ninguna de estas ribonucleasas tenga carácter tóxico. Sin embargo, existe otro grupo más de ribonucleasas extracelulares de hongos, con acción citotóxica, englobado bajo el nombre de ribotoxinas. Dado que son el objeto principal de los experimentos descritos en esta Memoria, se habla de ellas en un apartado posterior. Antes, es necesario introducir más en detalle otra de las ribonucleasas estudiadas en el trabajo aquí presentado.

La ribonucleasa U2

En 1968, Arima et al. aislaron cuatro ribonucleasas del medio extracelular de un hongo parásito de plantas, del género de los hongos del tizón, *Ustilago sphaerogena* (Arima et al., 1968 a y b), a las que llamaron U1, U2, U3 y U4. La RNasa U1 es específica para guaninas y neutra, muy similar a la T1 de *A. oryzae*, y se corresponde con la RNasa extracelular que habían aislado Glitz y Dekker (1964a y b). Las RNasas U2 y U3 son ácidas y rompen enlaces fosfodiéster tras adeninas y guaninas. Posteriormente, se ha visto que la U3 es la misma enzima que la U2. La RNasa U4, de la cual Blank y Dekker aislaron simultáneamente varias isoformas (Blank y Dekker, 1972a), es una exonucleasa que no presenta especificidad según la base (Arima et al., 1968b; Blank y Dekker, 1972b). De forma independiente, Rushizky et al. (1970) aislaron, de una cepa distinta del mismo hongo, una ribonucleasa extracelular cuyas características coincidían con las de la RNasa U2 aislada por Arima et al., por lo que los autores concluyeron que podía tratarse de la misma proteína.

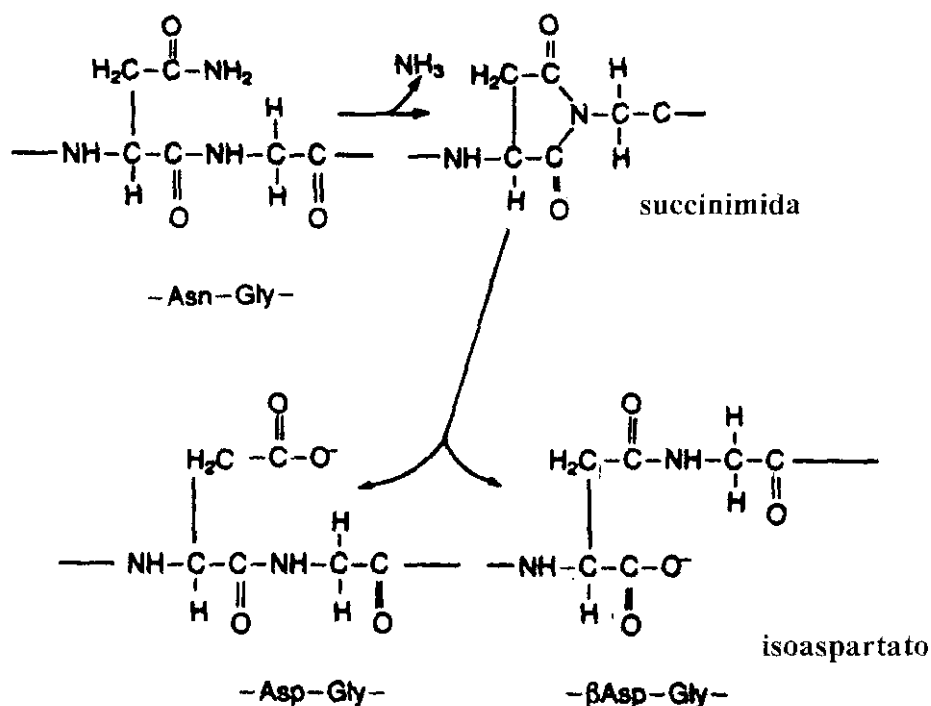
Después de su descubrimiento, esta enzima se estudió exhaustivamente, tanto en sus aspectos fisicoquímicos como, sobre todo, enzimáticos, especialmente por su utilidad para secuenciar RNA, en la que se aprovechaba su especificidad por purinas (revisado por Uchida y Egami, 1971; Egami et al., 1980), así como por su utilidad para sintetizar oligonucleotidos (Koike et al., 1971). Sin embargo, en la última década sólo se ha publicado la resolución por cristalografía de la estructura tridimensional de una isoforma covalentemente modificada (Noguchi et al., 1995), en la que el aspártico 45 se transforma en un isoaspartato, y, de forma preliminar, la estructura de cristales de complejos de la proteína con análogos de sustrato (Noda et al., 1997).

La RNasa U2 (EC 3.1.27.4) está formada por 114 aminoácidos que le confieren una masa molecular de 12400 (Sato y Uchida, 1975a; Kanaya y Uchida, 1986 y 1995), y posee tres puentes disulfuro (Sato y Uchida, 1975c).

Se ha estudiado en detalle su actividad enzimática que es, como en el resto de RNasas microbianas extracelulares, la ruptura de enlaces fosfodiéster internos del RNA en las dos etapas ya descritas (figura 4). Sin embargo, esta proteína presenta dos particularidades. Una es su intervalo funcional de pH, entre 3.5 y 5.5 (Arima et al., 1968b). La otra es la especificidad que presenta por la base cuyo fosfato 3' es hidrolizado: acepta no sólo guanina, sino también adenina en esta posición, incluso prefiriendo esta última (Uchida et al., 1970). Como ocurre con casi todas las demás RNasas, también son sustratos de la proteína los dinucleosidos monofosfato y nucleótidos cíclicos en 2':3' (Rushizky et al., 1970; Uchida et al., 1970), lo que ha permitido un estudio detallado de sus características enzimáticas frente a este tipo de sustratos, permitiendo entre otras cosas la asignación de los pK_a de los residuos que actuarían como ácido y base generales (Yasuda e Inoue, 1982).

Gracias al desarrollo de una metodología para purificación mediante cromatografía de afinidad, se observó la presencia de dos isoformas en las preparaciones de la proteína aislada de su fuente natural (Uchida y Shibata, 1981). La primera de ellas, llamada U2-A, es mayoritaria y es el producto natural de la traducción del gen, por lo que se considera simplemente la RNasa U2. La segunda, U2-B, es un componente minoritario, que presenta la misma especificidad de base y la misma afinidad por ApA que la U2-A, pero tiene un 75% de la actividad específica de la otra isoforma (Uchida y Shibata, 1981). Esta isoforma presenta un isoaspartato en la posición 32, donde la asparagina natural se ha desamidado y ha sustituido el enlace peptídico normal del carboxilo α por otro en el que participa el carboxilo β formado (figura 2), reacción que según los autores se produce por incubación en un medio alcalino (Kanaya y Uchida, 1986), aunque también se ha descrito la formación de este tipo de enlaces a pH próximos a 4.0 (Oliyai y Borchardt, 1993). Hay que destacar, sin embargo, que el espectro de dicroísmo circular en el UV lejano sufre una variación muy acusada (Uchida y Shibata, 1981), que revela un cambio importante en la conformación, que podría ser más importante a la hora de explicar la menor actividad específica observada.

Aunque se obtuvieron cristales de tipo I de la RNasa U2 hace veinte años, y se describió su caracterización preliminar en la primera reunión internacional sobre ribonucleasas (Matsuzaki et al., 1989), no se resolvió en detalle una estructura cristalina de la proteína hasta la publicación en 1995 (Noguchi et al.) de la estructura de un cristal de tipo II, en el que se forma un enlace isoaspartato entre los residuos Asp 44 y Glu 45. Esta región parece estar implicada en el reconocimiento de la base específica, y el mencionado enlace isoaspartato es distinto del que se forma en la RNasa U2-B, y no participa una Gly, como suele pasar en este tipo de modificación postraduccional. Así, a la



isoforma descrita en este cristal se le denominó U2-C y los propios autores **Figura 2:** Formación de enlaces isoaspartato a través de un intermedio succinimida (tomado de Wold, 1985). También se puede formar la succinimida a partir de un residuo de aspartato. En el caso de la RNasa U2, hay dos secuencias Asx-Gly que podrían sufrir esta reacción.

sugieren que esta isomerización se hubiera producido cuando las moléculas se agregaran al cristal, durante el largo tiempo (cerca de un año a pH 4,5) en que se estuvo formando, dado que no se detectó esta isoforma en la solución madre, y quizá debido a que la estructura de Asp 45 normal no pueda ser empaquetada en la celda del cristal de tipo II (Noguchi et al., 1995). En la estructura del cristal también se explica que, de los dos pares Asn-Gly presentes en la molécula (residuos 32-33 y 68-69), sólo se forme un enlace isoaspartato (el que genera la isoforma U2-B) en el primero, puesto que se encuentra precediendo un bucle flexible, entre Asp 34 y Asp 37. Eso le permite girar sus ángulos de torsión y situarse en una posición en que se puede dar la reacción entre el C γ de la asparagina y el N de la glicocola. La formación de este enlace puede imponer algún cambio en la conformación o la dinámica de la His 41 cercana, lo que explicaría que se redujera la actividad en la forma U2-B aunque la constante de disociación del ApA parece ser la misma (Uchida y Shibata, 1981). Sin embargo, en el caso del par 68-69, su rotación se encuentra limitada por la conformación del enlace Gly 68-Pro 70 (Noguchi et al., 1995), y no es posible la reacción de ciclación.

En cuanto a la estructura general de la proteína, se encontró que se adapta al motivo general de toda la familia de RNasas microbianas extracelulares (figura 3), con una lámina β antiparalela en posición central, en cuya parte cóncava se sitúan los residuos catalíticos, y con una hélice α en la otra cara, así como una horquilla β en el extremo amino.

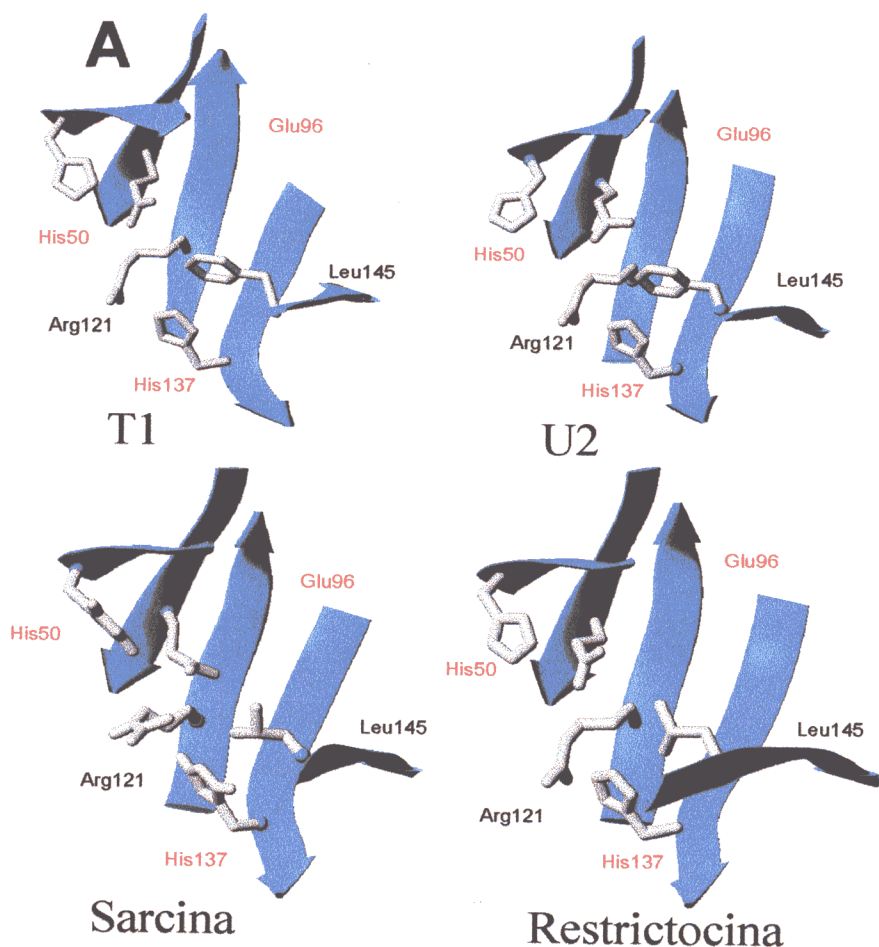


Figura 3: Comparación estructural de las ribotoxinas α -sarcina y restrictocina con las RNasas T1 y U2. A: Detalle de las estructuras tridimensionales mostrando los residuos catalíticos estudiados en esta Tesis (en rojo), y algunos otros situados en el entrono del centro activo (en negro).

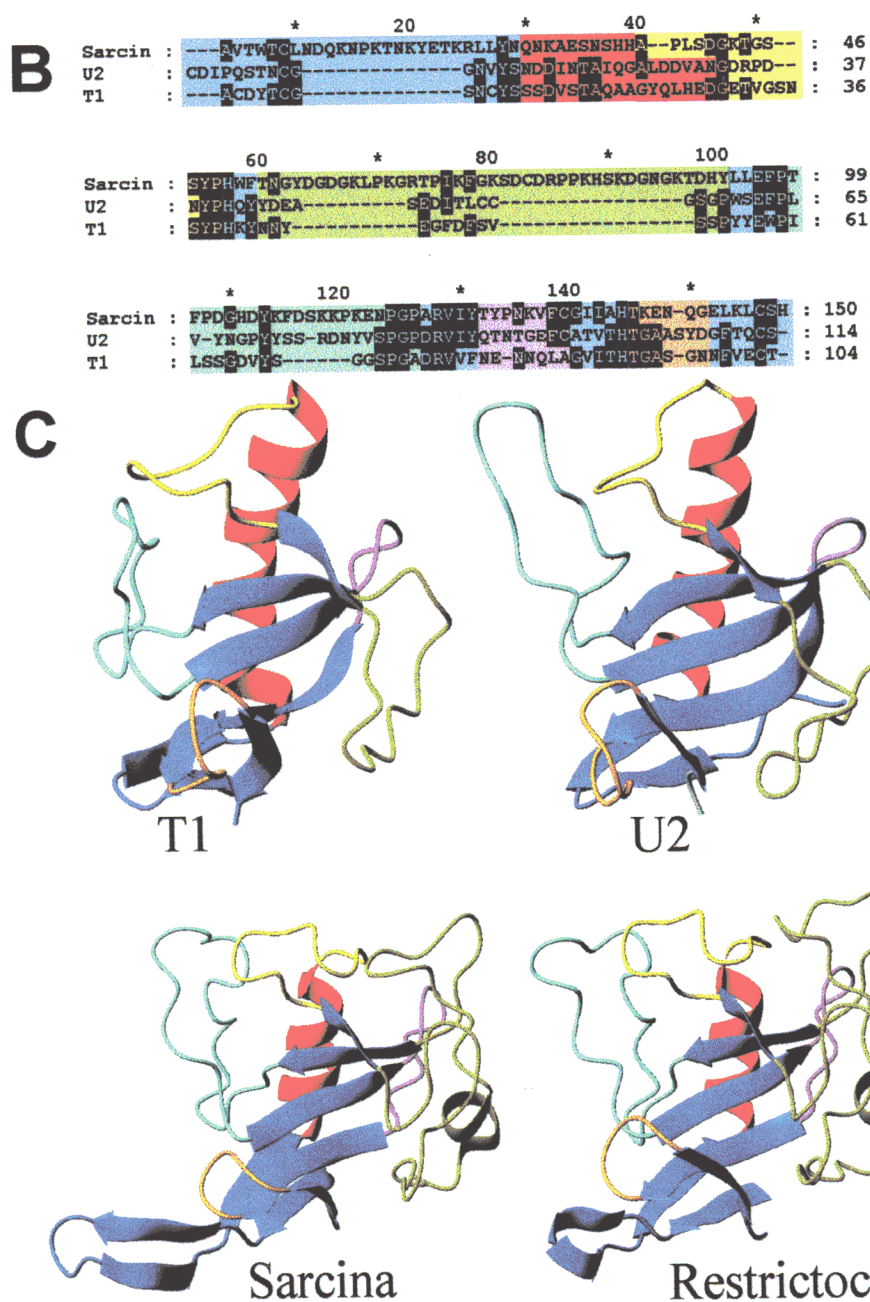


Figura 3 (cont.): B: Alineamiento de las secuencias primarias, realizado según la disposición de los residuos en la estructura tridimensional. El sombreado indica las identidades de secuencia, y los colores son los de los elementos de estructura secundaria descritos en la tabla 6. **C:** Representación en cinta de las estructuras tridimensionales, según las coordenadas del PDB: RNasa T1 (1rnt), RNasa U2 (1rtu), restrictocina (1aqz, cadena A); y de uno de los

conformeros de la α -sarcina (Pérez-Cañadillas et al., 2000). Los colores son los mismos que en **B**. Nótese que la horquilla del extremo amino de la restrictocina no está completa.

Finalmente, se ha descrito de forma preliminar la estructura de cristales de RNasa U2 con análogos de sustrato, con un análogo del intermedio de reacción, y con 3'-AMP (Noda et al., 1997), aunque estas estructuras no están disponibles ni se han publicado en detalle. Según esta descripción, la base de adenina formaría enlaces de hidrógeno con el esqueleto de Tyr 44 y con la cadena lateral de Glu 49, y el fosfato a hidrolizar queda rodeado por Tyr 39, His 41, Glu 62, Arg 85 e His 101 (Noda et al., 1997).

El mecanismo catalítico de las ribonucleasas microbianas

Takahashi (1970) propuso hace treinta años, basándose en la modificación química de la proteína, un mecanismo catalítico de tipo ciclante para la RNasa T1, similar al que ya se había propuesto para la RNasa A (Findlay et al., 1961; Roberts et al., 1969), en el que dos residuos de la proteína participarían como ácido y base generales en dos etapas, como se expresa en la figura 4. En la primera, el Glu 58 participaría como base, y una His como ácido. En estatransfosforilación del enlace fosfodiéster, el resultado sería la formación de un enlace fosfodiéster cíclico, unido por 2' y 3' a la ribosa. En la segunda etapa, se hidrolizaría el enlace en 2', con la participación de una His como base y el Glu como ácido. Desde entonces, sin embargo, se ha tardado mucho en determinar inequívocamente cuál era el papel de cada residuo implicado en la catálisis (revisado en Steyaert, 1997). En este trabajo ha tenido un papel fundamental el estudio de proteínas mutadas de forma específica, además de la determinación de la estructura tridimensional de la proteína con gran resolución. Se ha confirmado el mecanismo propuesto por Takahashi, asignándose a la His 92 el papel de ácido en la primera reacción, y de base en la segunda. Este par Glu/His es también el par habitual en el resto de RNasas microbianas extracelulares (Nonaka et al., 1993), en contraposición con los residuos catalíticos de la RNasa A, que son las His 12 y 119 (delCardayré et al., 1995). Más difícil ha sido establecer el papel de la His 40 que, según los datos de la estructura tridimensional, queda cercana al Glu 58, y al mismo lado respecto al sustrato, y que ayudaría a éste a realizar la catálisis (Steyaert et al., 1990, Nonaka et al., 1993). De hecho, durante mucho tiempo hubo controversia sobre el papel de ese residuo, ya que Nishikawa et al. (1996) postularon que la His 40 sería el residuo catalítico, junto con la His 92, basándose en las medidas de actividad de mutantes de los tres residuos implicados. Sin embargo, la mayoría de los estudios confirman el papel del Glu 58 como la base general en la primera reacción, en la que la His 40 sería necesaria en su estado protonado

para una actividad óptima, participando en la estabilización del estado de transición (Steyaert et al., 1990; Steyaert, 1997). Sin embargo, en los mutantes en que está sustituido el Glu 58, parece que la His 40 puede participar como base general de la transfosforilación, lo que explica la actividad residual que se observa en este tipo de mutantes (Steyaert et al., 1990; Steyaert y Wyns, 1993).

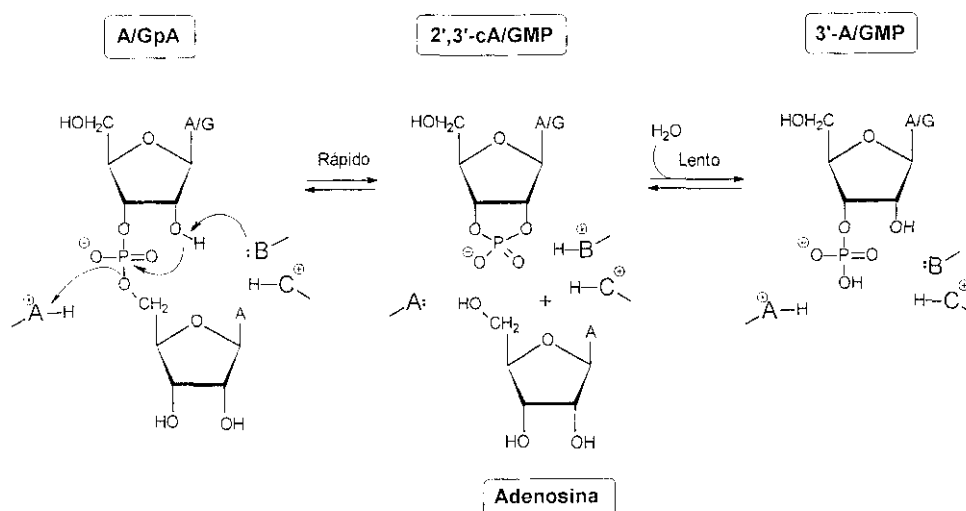


Figura 4: Mecanismo ciclate de ribonucleasas ejemplificado en la reacción con un dinucleótido. A sería el residuo que actúa como ácido general en la transfosforilación, y B la base general. C sería la His que no participa directamente.

En cuanto a la RNasa U2, también se demostró que actuaba por un mecanismo de tipo ciclate, puesto que el producto principal de la hidrólisis de RNA eran fragmentos terminados con un fosfato cíclico en 2':3' (Arima et al., 1968b). Los residuos catalíticos no han sido estudiados con tanto detalle, puesto que no ha sido posible la mutagénesis de esta proteína, ya que hasta la fecha no se había caracterizado su gen correspondiente. Los residuos homólogos del centro activo serían His 41, Glu 62 e His 101, siendo probablemente la His 101 y el Glu 62 el ácido y la base, respectivamente, en la transfosforilación, según se deduce de la estructura obtenida por cristalografía de rayos X (Noguchi et al., 1995). Estos dos residuos, así como otros que aparecen en el centro activo de la RNasa T1 (Tyr 39, Arg 85, según la numeración de la U2) están en el cristal en posiciones similares a las de la RNasa T1 (Gohda et al., 1994), quedando sólo la His 41 algo más alejada (Noguchi et al., 1995).

Las ribotoxinas fúngicas

Dentro de las ribonucleasas microbianas extracelulares las ribotoxinas fúngicas forman un grupo especial, que muchos autores no consideran al revisarlas, y que es el objeto principal de estudio de esta Tesis. Son proteínas algo mayores que el resto de las ribonucleasas microbianas que ya se han introducido, pero parecen tener el mismo motivo de plegamiento y el mismo mecanismo catalítico, por lo que pertenecen a la superfamilia, aunque su especificidad es claramente mayor, a la vez que se les puede atribuir actividades añadidas, como se discute más adelante. En este sentido, serían el resultado de una evolución divergente, que se habría producido para adquirir una mayor especialización y, de hecho, se las considera un producto de «ingeniería natural de proteínas» (Lamy et al., 1991; Kao y Davies, 1995 y 1999). Esto sucede también en otras superfamilias de RNasas, como la de la RNasa A, o la de la RNasa T2 (tabla 2), lo que ya fue denominado por D'Alessio et al. (1991) como «risbasas» (ribonucleasas con actividad biológica especial, con el acrónimo traducido del inglés).

Tabla 2: Risbasas: ribonucleasas con actividad biológica especial (D' Alesio et al., 1991).

RISBASA	ORIGEN	ACTIVIDAD BIOLÓGICA ESPECIAL
<u>Reino Animal</u>		
RNasa seminal bovina (BS-RNasa)	Vesículas seminales bovinas	Inducción de infertilidad Antitumoral Inmunosupresora
Angiogenina	Plasma humano	Angiogénica Inactivación del ribosoma
EDN (Toxina derivada de eosinófilos)	Hígado humano Eosinófilos humanos	Neurotóxica
ECP (proteína catiónica de eosinófilos)	Eosinófilos humanos	Neurotóxica
RNasa	Huevos de rana toro	Lectina
Onconasa	Huevos de rana pipiens	Antiviral (Anti HIV)
<u>Reino Vegetal</u>		
Producto del gen S	<i>Nicotiana glauca</i>	Auto-incompatibilidad gametofítica
<u>Reino Hongos</u>		
α -sarcina	<i>Aspergillus giganteus</i>	Inactivación del ribosoma

Se puede considerar que ha tenido lugar también una evolución convergente con otra gran familia de proteínas de plantas, denominadas RIP (*ribosome-inactivating proteins*, la más conocida es la ricina), puesto que todas

ellas, incluidas las ribotoxinas fúngicas, son capaces de inactivar la funcionalidad del ribosoma, actuando sobre la misma localización del rRNA, como se describe más adelante. Entre las RIP de plantas hay dos grupos de proteínas, según el número de cadenas polipeptídicas (tabla 3; Stirpe et al., 1992). Las RIP de tipo II están compuestas por dos cadenas, una que posee la actividad catalítica sobre el ribosoma (cadena A), y otra que facilita su entrada en las células. En el caso de la ricina, por ejemplo, la cadena B es una lectina, capaz de unirse a estructuras de la superficie celular con galactosa que actúan como receptores (Lord et al., 1994). La toxina entra por endocitosis (Van Deurs et al., 1989) y alcanza, por transporte inverso en la ruta de secreción, al retículo endoplásmico (Sandvig et al., 1992), desde donde se transloca la cadena A al citoplasma (Rapak et al., 1997); Wesche et al., 1999). Las de tipo I, sin embargo, presentan una sola cadena polipeptídica, en la que están presentes los elementos necesarios para la catálisis y la entrada en células. No se conoce, por el momento, cuál es el mecanismo molecular fisiológico por el que entran en las células pero, al menos, no se ha conseguido detectar la presencia de receptores específicos. Dada su similar forma de actuar, también se considera a las ribotoxinas dentro de esta familia, como RIP de tipo I, aunque estructural y catalíticamente son completamente distintas de las RIP de plantas.

Tabla 3: Enumeración de algunas de las RIP más representativas, incluyendo a las ribotoxinas fúngicas, y algunas de sus características más significativas.

Toxina	Organismo productor	Características	Referencia	Actividad enzimática
TIPO I: Formadas por una única cadena polipeptídica				
Amarantina	<i>Amaranthus viridis</i>	30 kDa	Kwon et al., 1997	N-glicosidasa
Betavulgina	<i>Beta vulgaris vulgaris</i>	30 kDa	Hornung et al., 1996	N-glicosidasa
Bridodinas 1, 2	<i>Bryonia dioica</i>	28 kDa	Gawlak et al., 1997	N-glicosidasas
Canforina	<i>Cinnamomum camphora</i>		Li et al., 1997	N-glicosidasa
Diantina	<i>Dianthus caryophyllus</i>	30, 32 kDa	Legname et al., 1991	N-glicosidasas
Ebulitinas α , β , γ	<i>Sambucus ebulus</i>	32 kDa (α), 29 kDa (β , γ)	De Benito et al., 1995	N-glicosidasas
Gelonina	<i>Gelonium multiflorum</i>	31 kDa; glicoproteína	Endo et al., 1988	N-glicosidasa
Gipsofilina	<i>Gypsophila elegans</i>	28 kDa	Yoshinari et al., 1997	N-glicosidasa
JIP60	<i>Hordeum vulgare</i>	60 kDa	Chaudhry et al., 1994	N-glicosidasa
Kiriliwinas α , β	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	28.8 kDa(α), glicoproteínas	Wong et al., 1996	Glicosidasas
Momorecharinas α , β	<i>Momordica charantia</i>	glicoproteínas	Ng et al., 1994	N-glicosidasas
Momordina	<i>Momordica charantia</i>	28.7 kDa; glicoproteína	Wang et al., 1998	N-glicosidasa
PAP	<i>Phytolacca americana</i>	29 kDa.	Endo et al., 1988	N-glicosidasa
PD-S2	<i>Phytolacca dioica</i>	29.6 kDa; glicoproteína	Chen et al., 1991	N-glicosidasa
Pepocina	<i>Cucurbita pepo</i>	26 kDa	Del Vecchio et al., 1997	N-glicosidasa
			Yoshinari et al., 1996	N-glicosidasa

Toxina	Organismo productor	Características	Referencia	Actividad enzimática
Proteína antiviral mirabilis (MAP)	<i>Mirabilis jalapa</i>	27.8 kDa	Habuka et al., 1989	N-glicosidasa
Saporina	<i>Saponaria officinalis</i>	30 kDa	Endo et al., 1988	N-glicosidasa
Sechiumina	<i>Sechium edule</i>	27 kDa	Wu et al., 1998	N-glicosidasa
Tricoanguina	<i>Trichocanthes anguina</i>	35 kDa; glicoproteína	Chow et al., 1999	N-glicosidasa
Tricomaglina	<i>Trichosanthes lepiniate</i>	24.7 kDa	Chen et al., 1999	N-glicosidasa
Tricosantina	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	27 kDa	Maragarone et al., 1987	N-glicosidasa
α -sarcina	<i>A. giganteus</i>	17 kDa	Olson et al., 1965	Ribonucleasa
AspFl	<i>A. fumigatus</i>	17 kDa	Arruda et al., 1990	Ribonucleasa
Clavina	<i>A. clavatus</i>	17 kDa	Parente et al., 1996	Ribonucleasa
c-sarcina	<i>A. clavatus</i>	17 kDa	Huang et al., 1997	Ribonucleasa
Gigantina	<i>A. giganteus</i>	17 kDa	Salvarelli et al., 1994	Ribonucleasa
Mitogilina	<i>A. restrictus</i>	17 kDa	Roga et al., 1971	Ribonucleasa
Restrictocina	<i>A. restrictus</i> , <i>A. fumigatus</i>	17 kDa	Goldin et al., 1966; Moser et al., 1992	Ribonucleasa
Hirsutelina A	<i>Hirsutella thompsonii</i>	14.7 kDa	Liu et al., 1993	Ribonucleasa
Lufina-S	<i>Luffa cylindrica</i>	10 kDa	Gao et al., 1994	α -Fosfodiesterasa?
TIPO II: Formadas por dos cadenas polipeptídicas				
Abrina	<i>Abrus precatorius</i>	65 kDa; glicoproteína; Receptor	Olsnes y Pihl, 1982	N-glicosidasa
Ricina	<i>Ricinus communis</i>	62 kDa; glicoproteína; Receptor	Endo y Tsurugi, 1987	N-glicosidasa
Modecina	<i>Adenia digitata</i>	63 kDa; glicoproteína; Receptor	Olsnes y Pihl, 1982	N-glicosidasa
Toxina de Shiga	<i>Shigella dysenteriae</i> I	58-70 kDa; AB ₀ -AB ₂	O'Brien y Holmes, 1987	N-glicosidasa
Ebulinas I, r1 y r2; f	<i>Sambucus ebulus</i>	56 kDa; polimérica (f) glicoproteínas	Girbés et al., 1993; Citores et al., 1997, 1998	N-glicosidasas
Nigrina b	<i>Sambucus nigra</i>	58 kDa; glicoproteína	Girbés et al., 1993	N-glicosidasa
Nigrina básica b	<i>Sambucus nigra</i>	64 kDa	De Benito et al., 1997	N-glicosidasa
Sieboldina b	<i>Sambucus sieboldiana</i>	60 kDa; glicoproteína; Receptor	Rojo et al., 1997	N-glicosidasa
Cinamomina	<i>Cinnamomum camphora</i>	glicoproteína	Li et al., 1997	N-glicosidasa
Porrectina	<i>Cinnamomum porrectum</i>	64 kDa; glicoproteína	Li et al., 1996	N-glicosidasa
Lectina I del muérdago (ML-I)	<i>Viscum album</i>	63 kDa; glicoproteína	Eschenburg et al., 1998	N-glicosidasa

El descubrimiento de las ribotoxinas

La α -sarcina es la primera ribotoxina que se descubrió, dentro de un programa de búsqueda de sustancias antitumorales llevado a cabo por Birger Olson y otros colaboradores del Departamento de Salud de Michigan

(Michigan Department of Health, MDH), tras haber aislado una cepa de *Aspergillus giganteus* (numerada MDH 18894) que producía una sustancia que inhibía tumores de rata, en concreto los llamados sarcoma 180 y carcinoma 755. De la actividad antisarcoma vino el nombre de α -sarcina, y se caracterizó con cierto detalle la proteína aislada (Olson, 1963; Olson y Goerner, 1965; Olson et al., 1965). Otras dos ribotoxinas, restrictocina y mitogilina, se descubrieron de la misma forma, aisladas de cepas de *A. restrictus* (Olson, 1966). Tanto la α -sarcina como la restrictocina se evaluaron clínicamente como agentes anticancerígenos, pero se desecharon por sus efectos secundarios (Goldin et al., 1966, Roga et al., 1971). No se volvió a saber nada de estas proteínas, hasta que a final de los años setenta se descubrió su mecanismo de acción molecular, como inactivantes del ribosoma y, en concreto, rompiendo un fragmento del rRNA ribosomal en una secuencia altamente conservada. Después, en los años ochenta, se secuenciaron las tres proteínas (Sacco et al., 1983; López-Otín et al., 1984; Fernández-Luna et al., 1985), tras haberse establecido su homología al comparar parte de sus secuencias (Rodríguez et al., 1982) y sus características químicas y espectroscópicas (Gavilanes et al., 1983).

Más tarde, en 1990, se clonó y secuenció el gen de un alérgeno de *A. fumigatus*, AspFI, que era casi idéntico a la mitogilina y a la restrictocina (Arruda et al., 1990). A partir de entonces se caracterizaron los genes de las ribotoxinas ya conocidas (Oka et al., 1990; Lamy y Davies, 1991; Lamy et al., 1991; Wnendt et al., 1993), y de otras nuevas: clavina (Parente et al., 1996) y c-sarcina (Huang et al., 1997) de distintas cepas de *A. clavatus*; gigantina, de otra cepa de *A. giganteus* (Wirth et al., 1997); y seis genes descubiertos en cepas de distintas especies de *Penicillium*, que se han denominado a-sarcinas (Lin et al., 1997). El grupo de Alan Lin también hizo una detección de la presencia de ribotoxinas en otras cepas de *Aspergillus* (Lin et al., 1995). La detección y secuenciación de nuevas ribotoxinas, así como el estudio de la relación filogenética entre ellas, es uno de los objetivos de esta Tesis.

Su actividad ribonucleolítica altamente específica

El mecanismo molecular de acción de las ribotoxinas no se conocía cuando se descubrieron y se evaluaron clínicamente como agentes antitumorales. Fue durante la década de los setenta cuando Julian Davies, entonces en la Universidad de Wisconsin en Madison (EE.UU.), con Daniel Schindler, que realizaba su tesis doctoral, descubrieron que la α -sarcina inhibía la biosíntesis de proteínas al probar su efecto sobre extractos de germen de trigo, que usaban para evaluar la acción de diversos antibióticos (Schindler, 1976; Schindler y Davies, 1977). Parte de estos resultados se han publicado

bastante tiempo después, cuando Julian Davies estaba ya en París, en el Instituto Pasteur (Lamy et al., 1992), pero lo que sí publicaron es que se producía la inhibición de la biosíntesis por la escisión de un fragmento de unos 300 pb localizados en el extremo 3' del rRNA 28S de eucariotas (Schindler y Davies, 1977). Los grupos de David Vázquez y Eric Cundliffe, que trabajaban también en la caracterización de sustancias inhibidoras de la biosíntesis de proteínas y colaboraban con Julian Davies, estudiaron más en profundidad la acción sobre el ribosoma (Fernández-Puentes y Vázquez, 1977; Conde et al., 1978; Hobden y Cundliffe, 1978). En cuanto a la mitogilina y restrictocina, su caracterización enzimática confirmó que su mecanismo general de acción era el mismo (Conde et al., 1978; Fando et al., 1985).

El siguiente paso en el esclarecimiento del modo de actuación de la α -sarcina y otras ribotoxinas en el ribosoma fueron los estudios del grupo de Ira Wool en la Universidad de Chicago, cuando, en una serie notable de trabajos (Endo et al., 1982, 1983; Chan et al., 1983; revisado en Wool, 1984), caracterizaron con gran detalle la actividad ribonucleolítica específica de la α -sarcina, localizando el sitio de corte dentro del rRNA, a la vez que estudiaron otras actividades menos específicas de la α -sarcina, capaz de hidrolizar RNA aislado en los enlaces fosfodiéster situados en 3' de bases púricas, y también de hidrolizar DNA, pero de forma poco eficiente y muy dependiente de las condiciones del ensayo. Estos estudios iniciales se han ido completando, por lo que hoy se conoce con bastante más detalle, tanto la estructura en el ribosoma del sitio de corte de las ribotoxinas, como los elementos de este sitio que utilizan las ribotoxinas como reconocimiento para ejercer su acción ribonucleolítica específica (revisado en Wool, 1997).

La α -sarcina produce la hidrólisis de un único enlace fosfodiéster, entre las bases G4325 y A4326 (según la numeración de la molécula de rata) del RNA ribosomal 28S de la subunidad mayor del ribosoma, localizado en una región muy conservada evolutivamente (Endo y Wool, 1982; Chan et al., 1983; Endo et al., 1983; Wool, 1984; figura 5). La hidrólisis de este enlace produce la liberación de un fragmento de rRNA conocido como fragmento α , correspondiente al extremo 3' del rRNA 28S (Schindler y Davies, 1977; Brigotti et al., 1989; Furutani et al., 1992). Consecuentemente, esta inactivación del ribosoma bloquea la síntesis de proteínas y produce, finalmente, la muerte celular. Esta acción es tan extraordinariamente específica y eficiente que la entrada de una única molécula por célula es responsable de la acción letal observada (Olsnes y Pihl, 1982).

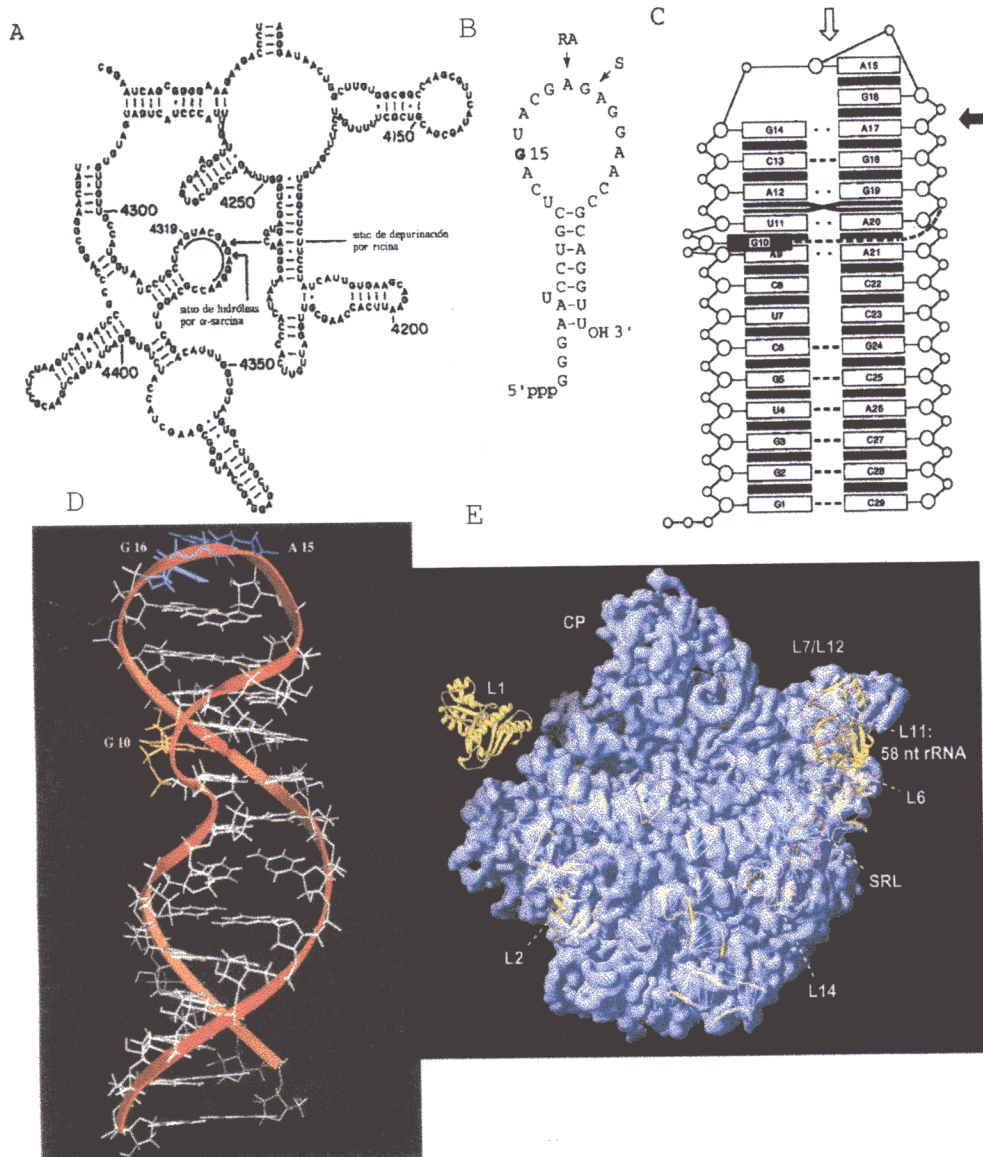


Figura 5: El lazo de sarcina/ricina (SRL). **A:** Representación de una parte del rRNA 28S de rata (Glück y Wool, 1996), destacándose el SRL, y los sitios de corte de α -sarcina y ricina, y la «guanina prominente», G 4319. **B:** Un oligonucleótido de 35 bases que mimetiza el SRL (Glück y Wool, 1996), marcando también los sitios de actuación. La guanina prominente es aquí la G 15. Sólo se consideran los apareamientos canónicos, por lo que la estructura no es como la determinada. **C:** Esquema de los apareamientos deducidos de la estructura de un oligonucleótido de 29 bases, resuelta por RMN (Szewczak et al., 1993; Szewczak y Moore, 1995). La flecha blanca indica el sitio de despurinación de la ricina (A 15), y la negra el de transfosforilación de las ribotoxinas (entre G 16 y A 17). La guanina prominente es aquí la G 10. **D:** Representación de la conformación tridimensional según RMN (Glück y Wool, 1996, según las coordenadas del PDB: Szewczak et al., 1993). **E:** Estructura de la subunidad grande (50S) del ribosoma de la bacteria *Haloarcula marismortui*, resuelta por cristalografía, vista desde la interficie entre las dos subunidades, indicando la posición del SRL (Ban et al., 1999).

¿Cómo se ejerce esta acción tan específica? De hecho, el enlace que hidroliza la α -sarcina forma parte de un motivo universal de 12 nucleótidos, que constituye la secuencia más larga de rRNA en la cual se conservan sin interrupción todas las bases, en todos los organismos estudiados hasta la fecha (Gutell y Fox, 1988), incluyendo los del propio *A. giganteus* (Hobden, 1978; Miller y Bodley, 1988). En una base adyacente, la A4324 del rRNA 28S de rata (figura 5), es también donde se produce la pérdida de la base por la acción de las RIP de plantas, cuya actividad es de N-glicosidasa en vez de ribonucleolítica (Endo et al., 1987; Endo y Tsurugi, 1988; Sürpe et al., 1992). Por eso, a esta estructura se le conoce con el nombre de «lazo de sarcina/ricina» (SRL en sus siglas inglesas; figura 5). Esta secuencia tiene su correspondencia incluso en procariotas como *E. coli*, donde se extiende desde la A2654 a la A2665 del rRNA 23S (Noller et al., 1981). La gran conservación a lo largo de la evolución de esta estructura particular del ribosoma no se debe, evidentemente, a que sea el lugar de acción de estas dos familias de toxinas, aunque éstas aprovechen este hecho. En este dominio se unen sucesivamente los factores de elongación (EF-1 y EF-2 en eucariotas, EF-Tu y EF-G en procariotas) durante cada ciclo de incorporación de un aminoácido a la cadena polipeptídica que se está formando en el ribosoma (Moazed et al., 1988; Brigotti et al., 1989).

La estructura tridimensional de este lazo ha sido determinada mediante RMN en disolución (Szewczak et al., 1993; Szewczak y Moore, 1995) y cristalografía (Correl et al., 1998 y 1999; figura 5). Para ello, se sintetizó un fragmento de 27 nucleótidos, de secuencia idéntica a la de dicho lazo, y que es susceptible de ser hidrolizado por ambos tipos de toxinas, α -sarcina y ricina. De acuerdo con estos resultados, se trataría de una conformación muy estructurada, estabilizada por varios emparejamientos entre bases que no corresponden a los clásicamente conocidos como de Watson y Crick (figura 5). Así, no se trata de un lazo de 17 residuos, como se habría supuesto al principio, sino de una horquilla compacta con un lazo en su extremo, formado únicamente por dos nucleótidos. Su estructura se puede descomponer en tres pequeños motivos, ya caracterizados por separado en otras estructuras: un tetralazo GAGA, una G prominente y una corta hélice de tipo A. En la actualidad, se están realizando numerosos estudios, tanto bioquímicos, como estructurales, que están aportando muchos más datos sobre el papel del SRL, que está en una zona de gran funcionalidad del ribosoma, donde se unen los factores de elongación (Porse y Garret, 1999).

Antes de conocerse la estructura tridimensional de este dominio, el grupo de Wool ya había empezado a estudiar los elementos mínimos que serían necesarios para que la ricina y la α -sarcina ejercieran su acción. La primera sorpresa fue que ambos tipos de proteínas actuaran de forma bien diferente, en

cuanto a su reconocimiento del sustrato. Así, mientras que la ricina es capaz de despurinar cualquier tetralazo GAGA que esté cerrado por una corta hélice del tipo de Watson y Crick (Endo et al., 1991; Glück et al., 1992), la α -sarcina ataca a un residuo adyacente pero reconoce elementos estructurales muy diferentes, aunque en los primeros experimentos no se lograron identificar (Endo et al., 1990; revisado en Wool et al., 1992; Wool, 1996 y 1997). Sólo después de conocer la estructura se dirigió la atención hacia la «G prominente» (G10 en la estructura deducida por NMR; G15 en el oligo considerado por el grupo de Wool; G4319 en el rRNA de rata; figura 5), que ha resultado ser el elemento fundamental de reconocimiento; la delección de esta guanina en el oligonucleótido, o su sustitución por otra base, destruye la capacidad de reconocimiento por parte de la α -sarcina, a pesar de estar situada a 6 residuos de distancia (unos 15 Å) del enlace que es hidrolizado (Glück y Wool, 1996). Otra conclusión importante de este trabajo, obtenida mediante la inserción sucesiva de bases entre la guanina que representa este elemento de reconocimiento y el enlace que es hidrolizado, es que parece que la α -sarcina la utiliza como punto de orientación al unirse, tras lo cual cortaría el enlace que se encuentra a una cierta distancia, y no reconoce, estrictamente hablando, una secuencia concreta (Glück y Wool, 1996).

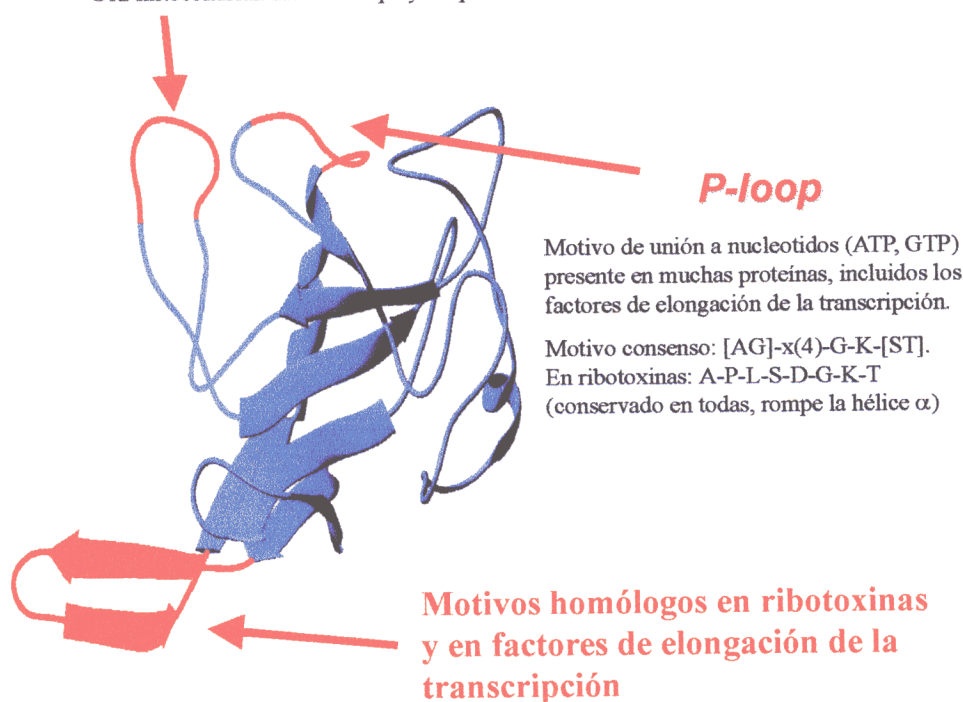
Aunque la α -sarcina presenta una elevada especificidad de sustrato, ésta es dependiente de la concentración de enzima (Wool, 1984). Así, cuando se utiliza rRNA como sustrato, y se incuba con bajas concentraciones de α -sarcina (menos de 30 nM), se produce la hidrólisis única del enlace G4325-A4326, liberando el fragmento α . Sin embargo, cuando la incubación se realiza con altas concentraciones de α -sarcina (más de 30 nM), se produce la hidrólisis inespecífica en el extremo 3' de guaninas (Endo et al., 1983; Wool, 1984; Endo et al., 1988). Se ha propuesto que esto podría deberse a la existencia de dos zonas en el sitio de unión a RNA: una de ellas de baja afinidad, que produce su hidrólisis inespecífica; y la segunda que reconoce con alta afinidad el motivo estructural de la G prominente (Szewczak y Moore, 1995).

En este mismo sentido, se ha descrito cómo la α -sarcina puede degradar homopolinucleótidos, si se añade a una concentración suficientemente alta (1-20 μ M) (Endo et al., 1983), manifestando una preferencia por aquéllos compuestos por purinas. Incluso, se ha descrito su capacidad para degradar DNA de doble cadena, si existe Mg^{2+} presente en el medio. Este último resultado se encuentra cuestionado pues, contrariamente a lo que ocurre con el DNA, la actividad ribonucleolítica de la α -sarcina se inhibe por la presencia de concentraciones milimolares de Mg^{2+} y Mn^{2+} (Endo et al., 1983; Martínez del Pozo et al., 1989) y molares de cationes monovalentes como Na^+ , K^+ o NH_4^+ (Endo et al., 1983).

La gran especificidad de sustrato que presentan la α -sarcina y el resto de ribotoxinas, en comparación con el resto de ribonucleasas microbianas extracelulares, con las que compartirían la estructura general y el mecanismo catalítico, plantea la pregunta de cuáles pueden ser los elementos en la estructura de las ribotoxinas que les permiten ese reconocimiento. En este sentido, ya desde que se describió la estructura primaria de la α -sarcina y se planteó su homología con las RNasas T1 y U2, se propuso que los residuos «extra» que presentan las ribotoxinas, al ser moléculas mayores que las otras RNasas, serían los responsables de esta especificidad (Sacco et al., 1983). Al predecirse un primer modelo de la estructura tridimensional de la proteína, ya se vio que los residuos extra quedarían en los lazos que conectan los elementos de estructura secundaria ordenada, que serían equivalentes a los de las ribonucleasas T1 o U2 (Mancheño et al., 1995a). Kao y Davies, por su parte (1995), también predijeron un modelo similar, y plantearon la hipótesis de que las ribotoxinas habrían evolucionado a partir de un gen de ribonucleasa específica de guaninas o purinas, incorporando los elementos extra que le permitirían centrar su especificidad de sustrato en el ribosoma, además de la capacidad de atravesar la membrana plasmática; de esta forma, estas proteínas habrían adquirido una funcionalidad biológica como toxinas, que sería la que habría dirigido su evolución. Concretamente, Kao y Davies han encontrado en todas las ribotoxinas tres elementos de secuencia que tienen relación con la estructura del ribosoma y que las ribotoxinas podrían haber «tomado prestados» de otros genes, adquiriendo así una capacidad en cierto modo mimética de las estructuras que rodean al SRL en el ribosoma (figura 6). Uno de ellos es un *P-loop* ($A^{37}PLSDGKT$ en todas las ribotoxinas; numeración de la α -sarcina), que es un motivo funcional de unión al nucleótido en proteínas que unen ATP o GTP. Otro es una secuencia homóloga ($K^{106}FDSKKPK$; en clavina y ϵ -sarcina sólo cambia la K inicial a N) a la que se encuentra en la proteína ribosomal S12 de varias especies. El tercer elemento es una secuencia homóloga ($T^{15}NKYETK$, en algunas ribotoxinas Y cambia a W, T cambia a D o N) a otra que se encuentra en algunos factores de elongación que, como ya se ha dicho, interaccionan con el SRL.

Motivos homólogos en ribotoxinas y en proteínas ribosomales S12

<u>Proteína</u>	<u>Organismo</u>	<u>Residuos</u>	<u>Secuencia</u>
Mitogilina	<i>Aspergillus restrictus</i>	106 - 113	KFDSKKPK
Restrictocina	<i>Aspergillus restrictus</i>	106 - 113	KFDSKKPK
α -sarcina	<i>Aspergillus giganteus</i>	107 - 114	KFDSKKPK
S12 ribosomal	<i>Thermus aquaticus</i>	119 - 126	KYGTKKPK
S12 ribosomal	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	128 - 135	KYGAKKPK
S12 ribosomal	<i>Cryptomonas phi</i>	115 - 122	KYGAKKPK
S12 ribosomal	<i>Zea mays</i>	116 - 123	KYGAKKPK
S12 ribosomal	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	129 - 136	KYGTKRPK
S12 mitocondrial	<i>Marchantia polymorpha</i>	116 - 123	KYGTKKPK



<u>Proteína</u>	<u>Organismo</u>	<u>Residuos</u>	<u>Secuencia</u>
Mitogilina	<i>A. restrictus</i>	14 - 20	TNKWEDK
Restrictocina	<i>A. restrictus</i>	14 - 20	TNKWEDK
α -sarcina	<i>A. giganteus</i>	15 - 21	TNKYETK
EF-1 α	<i>E. gracilis</i>	152 - 158	TNKFDDK
EF-2	<i>S. cerevisiae</i>	254 - 260	TKKWTNK
EF-3	<i>S. cerevisiae</i>	140 - 146	TNKWQEK

Figura 6: Secuencias ribosomales presentes en los lazos extra de las ribotoxinas, indicadas en rojo en una representación en cinta de la estructura tridimensional de la α -sarcina.

Citotoxicidad

Si bien las ribotoxinas, que son proteínas extracelulares, fueron descubiertas y estudiadas gracias a sus propiedades antitumorales (Olson et al., 1965; Goldin et al., 1966), los primeros estudios que se hicieron a nivel molecular acerca de su efecto sobre sistemas celulares parecieron revelar que la proteína sólo mostraba su carácter citotóxico frente a células previamente permeabilizadas por la infección con virus (Fernández-Puentes y Carrasco, 1980; Carrasco y Esteban, 1982; Muñoz et al., 1985; Otero y Carrasco, 1987; Liprandi et al., 1997; Cuadras et al., 1997) o por algún otro agente (Otero y Carrasco, 1986, 1987 y 1988).

Sin embargo, más recientemente se ha demostrado cómo también la α -sarcina presenta actividad citotóxica frente a líneas celulares de tumores humanos (Turnay et al., 1993; Olmo et al., 1993), corroborando así la caracterización inicial que condujo a su descubrimiento (Olson et al., 1965). De hecho, la proteína modifica el patrón de proliferación de las células, produciendo la inhibición de su crecimiento y, finalmente, la muerte celular. Todos estos efectos son, probablemente, consecuencia de la inhibición de la síntesis de proteínas, que se observa tras 18 horas de incubación. Teniendo en cuenta el análisis cinético de esta inhibición, se pueden observar dos fases; una primera, de retraso, dependiente de la concentración de α -sarcina, y una segunda, de primer orden con respecto a la concentración de proteína. Esto indicaría la existencia de un componente cinético saturable, previo a la inactivación de los ribosomas, que correspondería con el paso de la proteína a través de la membrana celular (Turnay et al., 1993).

Tras el fracaso de las primeras pruebas clínicas como agentes antitumorales (Goldin et al., 1966; Roga et al., 1971), se ha seguido intentando utilizarlas en aplicaciones clínicas, pero de forma que se limite su efecto citotóxico general en el organismo, a base de dirigirlas específicamente hacia las células que se quiere inactivar. Así, se han construido diversas inmunotoxinas, en las que las ribotoxinas utilizadas se unían a anticuerpos monoclonales que reconocen células tumorales (Orlandi et al., 1988; Conde et al., 1989; Wawrzynczak et al., 1991; Better et al., 1992; Rathore y Batra, 1996, 1997a y b; Rathore et al., 1997). Otro enfoque sería el de producir la ribotoxina localmente en los tumores, mediante la utilización de terapia génica, evitando así que se vean afectadas otras células del organismo, lo que se está intentando actualmente a través de una colaboración establecida con nuestro laboratorio.

En cuanto a la posible implicación de estas proteínas en la infección de humanos, habría que pensar principalmente en las ribotoxinas producidas por

Aspergillus fumigatus. Esta especie es la principal responsable de distintas enfermedades infecciosas (conocidas habitualmente como «aspergilosis»; tabla 4), que se dan con relativa abundancia en pacientes inmunodeprimidos en hospitales, y que son causa de numerosas muertes, ya que no hay un tratamiento eficaz una vez que se ha producido la infección. A pesar de que la producción de ribotoxinas se ha asociado con estas infecciones, y se considera el principal alérgeno de esta especie, la utilización, en sistemas modelo, de mutantes de *A. fumigatus* con el gen alterado no parece reducir su patogenicidad, por lo que no parece ser necesario para ésta, al menos en alguna de las enfermedades. Sí parece ser más importante su papel, sin embargo, en procesos alérgicos (Lamy et al., 1991; Moser et al., 1992; Arruda et al., 1992a y b y 1995; Paris et al., 1993; Smith et al., 1993 y 1994; Holden et al., 1994; Nicolaizik et al., 1995; Kurup et al., 1994 y 1998; Latgé, 1999).

Tabla 4: Enfermedades infecciosas producidas por *Aspergilli*.

Infección hospitalaria	Organismo responsable	Referencias
Aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA)	<i>A. fumigatus</i>	Bardana 1980; Greenberger, 1988
	<i>A. ochraceus</i>	Novey y Wells, 1978
Aspergilosis pulmonar invasiva (IPA)	<i>A. fumigatus</i>	Kothary et al., 1984; Spreadbury et al., 1989
Asma alérgico	<i>A. fumigatus</i>	Bardana 1980
Fibrosis quística asociada a ABPA	<i>A. fumigatus</i>	Zeaske et al., 1988
Dermatitis atípica	<i>A. fumigatus</i>	Disch et al., 1995
Aspergiloma	<i>A. fumigatus</i>	Bardana 1980; Greenberger, 1988
Neumonía hipersensible	<i>A. fumigatus</i>	Bardana 1980; Greenberger, 1988
	<i>A. flavus</i>	Arnold et al., 1991
Aspergilosis nosocomial	<i>A. flavus</i> / <i>A. fumigatus</i>	Lentino et al., 1982

La entrada en las células: interacción con membranas

Puede parecer obvio que, dado que las ribotoxinas son toxinas extracelulares que ejercen su actividad citotóxica sobre determinadas células diana, esta acción requiere varias etapas moleculares. Es fundamental su acción

catalítica específica, que inactiva el ribosoma. Pero, siendo el ribosoma un orgánulo citosólico, es también necesaria una etapa previa en la que la toxina entre en las células. Dado que la actividad inactivante del ribosoma se dirige hacia una estructura evolutivamente conservada, ésta podría tener lugar, en principio, en todo tipo de células. Por tanto, y ya que las ribotoxinas son tóxicas sólo para determinados tipos celulares y organismos, es lógico pensar que la selectividad de la acción citotóxica va a residir precisamente en la distinta capacidad para entrar en las células a las que ataque. Esta «actividad» de entrada en las células también las diferencia del resto de ribonucleasas microbianas extracelulares, que no presentan esta capacidad. En esta etapa de la entrada en células es donde se ha centrado tradicionalmente el estudio de las bases moleculares de la citotoxicidad de la α -sarcina por parte de nuestro grupo de investigación.

No se ha encontrado ningún receptor para las ribotoxinas, que ayude a su entrada en las células, a pesar de algunos intentos de búsqueda (Lin, A. y Wool, I.G., resultados sin publicar, citado en Wool, 1997). De hecho, las conclusiones que se han obtenido en nuestro laboratorio sugieren que la α -sarcina presenta en su propia estructura la capacidad para interaccionar con la membrana celular y translocarse al citosol. Como ya se ha dicho, esto es una diferencia clara con las RIP de plantas de tipo II, como la ricina, que sí utilizan elementos de las células como receptores (Stirpe et al., 1992; Lord et al., 1994); incluso parece que utilizan la maquinaria de translocación de proteínas defectuosas en el retículo endoplásmico, para conseguir que la cadena catalítica entre al interior celular (Wesche et al., 1999).

La aproximación que ha permitido estudiar la capacidad de la α -sarcina para atravesar membranas ha sido la de emplear sistemas modelos, formados por vesículas lipídicas (revisado en Gasset et al., 1994; Mancheño et al., 1994a). En primer lugar, la α -sarcina muestra una elevada afinidad por fosfolípidos ácidos, habiéndose descrito su capacidad para interaccionar con vesículas modelo compuestas por ellos (Gasset et al., 1989; Oñaderra et al., 1989; Mancheño et al., 1998b). Como consecuencia de la interacción, la α -sarcina produce la agregación de las vesículas, que se puede seguir por un aumento de los valores de absorbancia a 360 nm (Gasset et al., 1990). Esta agregación es dependiente de la relación molar proteína:lipido, alcanzándose la saturación cuando ésta es de 1:50. Los fosfolípidos ácidos son imprescindibles, detectándose interacción tanto cuando se utilizan vesículas de fosfatidilglicerol (PG; Gasset et al., 1990) como de fosfatidilserina (PS; Mancheño et al., 1994b y 1998b), pero no de fosfatidilcolina (PC; Gasset et al., 1990), un fosfolípido zwitteriónico. De esta forma, se detecta la existencia de un componente electrostático en la interacción. De hecho, variaciones en la

fuerza iónica del medio suponen modificaciones en la extensión de la agregación, pero no revierten la interacción una vez establecida, demostrando que también existe un componente hidrofóbico importante. Este resultado está también de acuerdo con lo observado al estudiar la influencia de la α -sarcina sobre el comportamiento termotrópico de las vesículas (Gasset et al., 1989, 1990, 1991a y b, 1995a y b).

Se ha descrito también la capacidad de la α -sarcina para producir fusión de membranas (Gasset et al., 1990). Para ello, se midió la mezcla de lípidos entre diferentes vesículas, registrando la disminución de la transferencia de energía por resonancia producida entre dos sondas fluorescentes incorporadas en una población de liposomas, cuando éstos se incuban con un exceso de vesículas sin marcaje y con α -sarcina (Gasset et al., 1990; Mancheño et al., 1994b). Este proceso implica la dimerización de moléculas de proteína durante los momentos iniciales de la interacción, como se ha determinado mediante estudios de flujo detenido, y además, ocurre concomitantemente con la mezcla de los contenidos acuosos intravesiculares (Mancheño et al., 1994b). La capacidad fusogénica de la α -sarcina también se ha detectado por estudios de microscopía electrónica por criofractura, observándose grandes estructuras multilamelares cuya existencia corroboraría los estudios espectroscópicos (Gasset et al., 1990 y 1991b).

La interacción de la α -sarcina con vesículas lipídicas supone también una protección de la proteína frente a hidrólisis triptica, a pesar de su alto contenido en residuos de lisina y arginina (Gasset et al., 1989; Oñaderra et al., 1989). Además, se ha descrito su capacidad para translocarse al interior de estos sistemas modelo (Oñaderra et al., 1993). Esto se demostró mediante dos tipos de ensayos: degradación de tRNA encapsulado en vesículas de asolectina, tras incubación con α -sarcina; y degradación de la α -sarcina por incubación con vesículas que llevaban tripsina encapsulada. En ambos casos se utilizaron controles para descartar la liberación espontánea de las moléculas encapsuladas, y por tanto una degradación extravesicular. De esta forma, se demuestra que la α -sarcina es capaz de translocarse al interior de las vesículas en un estado enzimáticamente activo. Estos ensayos no permiten determinar si la α -sarcina penetra totalmente al interior vesicular, o si permanece unida en la cara interna de la membrana pero con su centro activo accesible al interior de las vesículas. También se ha podido determinar mediante este tipo de ensayos la presencia de formas oligoméricas de la α -sarcina asociadas a la interacción con las vesículas lipídicas y la translocación a través de la bicapa (Oñaderra et al., 1998).

Esta translocación de la α -sarcina, junto con el resto de los resultados comentados, se explica suponiendo que la existencia del componente electrostático en la interacción permite su unión a membranas lipídicas, mientras que el componente de naturaleza hidrofóbica desestabiliza las bicapas, posibilitando su paso al interior de las vesículas. El componente electrostático de la interacción sería atribuido al gran número de residuos básicos que tiene esta proteína y que permitiría la interacción con las cabezas polares de los fosfolípidos ácidos, mientras que el componente hidrofóbico requeriría la existencia de zonas hidrofóbicas en la proteína que interaccionasen con la zona de las cadenas de acilo de la bicapa. Esta zona hidrofóbica, que no era evidente al observar la secuencia primaria de la α -sarcina (Sacco et al., 1983; Martínez del Pozo, 1988), se predijo que podía ser una lámina β central que sería equivalente a la lámina β central de las RNasas T1 y U2 (Mancheño et al., 1995a), cuya existencia se confirmó después al resolver la estructura tridimensional de la proteína (Campos-Olivas et al., 1996a y b; Pérez-Cañadillas et al., 2000). Así, para comprobar el papel de la lámina β en dicha interacción con las bicapas lipídicas, se sintetizó un péptido, denominado α S (116-139), que correspondería a dos de las hebras de la lámina β . Este péptido origina efectos similares a los producidos por la proteína completa en su interacción con vesículas, adoptando conformación β tras la interacción y confirmando, al menos de forma parcial, la hipótesis planteada acerca del papel de la mencionada lámina β (Mancheño et al., 1995b). Asimismo, se han sintetizado péptidos de menor tamaño correspondientes a la misma zona de la estructura de la α -sarcina, estableciendo que un péptido de nueve aminoácidos, correspondiente a los residuos 131-139 de la α -sarcina es suficiente para mimetizar dichos efectos (Mancheño et al., 1998a).

Por otro lado, la interacción de la α -sarcina con vesículas se traduce en una disminución en la estabilidad de la proteína (Gasset et al., 1995b). Se han realizado también ensayos de interacción utilizando α -sarcina reducida y carboxiamidometilada (Gasset et al., 1995a), de manera que, aunque ésta sólo contendría parte de su estructura β y giros β como ordenaciones periódicas, y aunque se encuentra mayoritariamente desestructurada, como sugiere su espectro de dicroísmo circular, sigue produciendo sobre las vesículas efectos similares a los obtenidos con la proteína nativa. Por tanto, la estructura nativa de la α -sarcina no es imprescindible para el establecimiento de su interacción con vesículas. Este resultado estaría también de acuerdo con la existencia de la lámina β hidrofóbica como soporte del componente no polar de la interacción, puesto que el porcentaje de este tipo de ordenación periódica es elevado en el complejo proteína-lípido que se forma, como se ha comprobado por espectroscopía de infrarrojo (Gasset et al., 1995a y b).

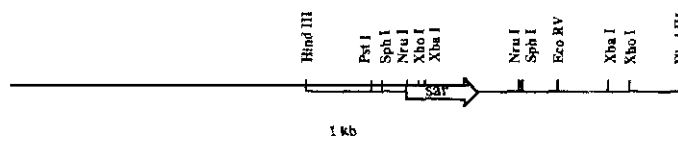
En definitiva, todos estos estudios de interacción de la α -sarcina con vesículas modelo, ponen de manifiesto la capacidad intrínseca de la proteína para interaccionar con membranas. Hay que recordar que la α -sarcina presenta capacidad citotóxica frente a numerosas líneas celulares de tumores humanos, sin que medie ningún tipo de permeabilización anterior de la membrana (Olson et al., 1965; Olmo et al., 1993; Turnay et al., 1993). Por tanto, parece que la α -sarcina se transloca al interior celular a través de su interacción con los fosfolípidos de las membranas.

En este sentido, los diferentes fosfolípidos actuarían como. Es muy significativo que la α -sarcina reconozca fosfolípidos ácidos, especialmente PS y PG, y no interaccione con PC. Se ha descrito la asimetría en la distribución de los fosfolípidos en las membranas plasmáticas, predominando generalmente PS y fosfatidiletanolamina (PE) en el interior celular, y PC y esfingomielina (SM) en el exterior (Connor et al., 1989; Devaux, 1993; Zachowski, 1993; Devaux y Zachowski, 1994; Williamson y Schlegel, 1994). Esta asimetría se mantiene gracias a la acción de varias proteínas que transportan en direcciones opuestas a distintos tipos de fosfolípidos, a las que se conoce como «flipasas» (Smit et al., 1993; Tang et al., 1996; Van Helvoort et al., 1996). La presencia de PS en la cara externa de la membrana es una consecuencia del inicio del proceso de apoptosis, lo que es aprovechado por los macrófagos, que presentan en su superficie receptores para este fosfolípido, que activan la endocitosis de la célula (Fadok et al., 1992a y b). Igualmente, en células tumorigénicas se ha detectado también una mayor presencia de PS en la cara externa de la membrana (Connor et al., 1989; Utsugi et al., 1991), que podría explicar la mayor especificidad para la entrada de la α -sarcina en algunas líneas tumorales, como ya se ha indicado.

Producción de ribotoxinas recombinantes

El primer sistema de producción de ribotoxinas por métodos recombinantes se publicó en 1990, y utilizaba un gen sintetizado químicamente, que codificaba la secuencia madura de la α -sarcina, fusionado a la secuencia señal de la proteína OmpA de *Escherichia coli*. La proteína así producida, sin embargo, no se exportaba de forma eficiente al espacio periplásmico, por lo que el rendimiento resultó ser muy bajo (Henze et al., 1990), aunque recientemente ha sido mejorado (Sylvester et al., 1997). También el grupo de Yaeta Endo, que publicó la primera secuencia de un gen de ribotoxina (el del cDNA de *sar*, que codifica la α -sarcina: Oka et al., 1990), produjo α -sarcina en *E. coli*, esta vez utilizando la secuencia señal de la β -lactamasa de la bacteria, pero sin el residuo de alanina del extremo amino de

A



seq	1	CGACCTTGGAAG	CGACATAAAG	AGGTCGTAGA	TTCTCCGGAC	TCTCCGAAC	AATCCCAAGA	TGATCATCAG	AGGCATCTCC	ATCTCATTA	
res	1	cgataaaagt	tggggttttt	tcgtctga	tttttttt	tgctgtgt	ttatgtagt	attttttt	tttgcctc	ttatgtttt	
Sar		1 Met Val Ala Ile	Lys Asn	Leu Val	Leu Val Ala	Leu Thr	Ala Val Thr Ala	Leu Val Val	Pro Ser	Pro Leu	
res	91	AA ATG GTT GCA ATC AAA	AAC GTT CTG	CTG GTG GGC	CTC ACC GGC	GGG ACC GGC	CTT GCA GTG	CCC TCG	CTC CTC		
res	91	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt		
Res		1 Met Val Ala Ile	Lys Asn	Leu Phe	Leu Leu Ala	Ala Thr	Ala Val Ser Val	Leu Ala Ala	Pro Ser	Pro Leu	
Sar		25 Glu Ala Arg Ala Val	<<< <<<				Intron ser			>>>	
res	165	GAG GCG CGC GCG GTG	GTA AGTA	CCCTTCTGATAAAA	CGAGTACTAATA	CTGGGAAGGC	TCCTTGAC	CGAATTCTT	CTAG		
res	165	ttc ttt ttt ttt ttt	ttt ttg	ttcattattttttg	gctctgagttt	actactagaca	tttttttt	ttc-----	tttt		
Res		25 Asp Ala Arg Ala	<<< <<<				Intron res			>>>	
Sar		38 Thr Trp Thr Cys	Leu Asn Asp	Gln Lys	Asn Pro	Lys Thr	Asn Lys Tyr	Glu Thr	Lys Arg	Leu Leu	Tyr Asn
res	245	ACC TGG ACC TGC TTC	AAC GAG CAG	AAG AAC CCC	AAG ACC AAC	AAC TAT	GAG ACC	AAA CGC	CTC CTC	TAC AAC	
res	229	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	
Res		29 Thr Thr Thr Cys	Ile Asn	Gln Gln	Leu Asn	Lys Thr	Asn Lys Tyr	Glu Thr	Lys Arg	Leu Leu	Tyr Ser
Sar		54 Gln Asn Lys Ala	Glu Ser	Asn Ser	His His	Ala Pro	Leu Ser	Asp Gly Lys	Thr Gly	Ser Ser	Tyr Pro
res	317	CAG AAC AAG CCC GAG	AGC AAG TCG	CAC CAT GGC	CGT CTC TCC	GAG GGC	AAG ACC	GGG ACC	AGC TAT	CTC CAC	
res	301	tta gcc tta ttt tta ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt	
Res		53 Gln Ala Lys Ala	Glu Ser	Asn Ser	His His	Ala Pro	Leu Ser	Asp Gly Lys	Thr Gly	Ser Ser	Tyr Pro
Sar		78 Trp Phe Thr Asn	Gly Thr	Asp Gly	Asp Gly	Lys Lys	Leu Pro	Lys Gly	Arg Thr	Pro Ile	Lys Phe
res	389	TGC TTC ACC AAC GGT	IAT CAT GGC	CAT GGA	AAG CTC	GCC AAG	GCG CCG	ACC ACC	ATC AAG	TTC GAG	AAA TCC
res	373	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	
Res		77 Trp Phe Thr Asn	Gly Thr	Asp Gly	Asn Gly	Lys Lys	Leu Ile	Lys Gly	Arg Thr	Pro Ile	Lys Phe
Sar		102 Asp Cys Asp Arg	Pro Pro	Lys His	Ser Lys	Asp Gly	Asn Gly	Lys Thr	Asp His	Tyr Leu	Leu Glu
res	461	GAC GGT GAC CGT CCT	CCC AAG CAC	AGC AAC	GAG GCA	ACC GGC	AAC ACT	GAT GAT	CAC CAC	CTG CTG	GAG TTC
res	445	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttg ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	
Res		101 Asp Cys Asp Arg	Pro Pro	Lys His	Ser Ser	Gln Asn	Gly Met	Gly Lys	Asp Asn	His Tyr	Leu Leu
Sar		126 Thr Phe Pro Asp	Gly His	Asp Tyr	Lys Phe	Asp Ser	Lys Lys	Pro Lys	Glu Asn	Pro Gly	Pro Gly
res	533	ACC TTC GCT GAT GGC	CAT GAC TAC	AAG TTT	GAT TCG	AAG AAG	CCC AAG	GAA AAT	CTC GGC	CGG GCG	GCG GTC
res	517	ttc ttt tta ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	
Res		125 Thr Phe Pro Asp	Gly His	Asp Tyr	Lys Phe	Asp Ser	Lys Lys	Pro Lys	Glu Asn	Pro Gly	Pro Gly
Sar		156 Ile Tyr Thr Tyr	Pro Pro	Asn Lys	Val Phe	Cys Gly	Ile Ile	Ala His	Thr Lys	Glu Asn	Gln Gly
res	505	ATC TAC ACC TAT CCT	AAC AAG GTG	TTT TGT	GCT ATT	ATT GCT	CAT ACT	AAG GAG	AAC CAC	GGC GAA	CTT AAG
res	589	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	ttt ttt ttt ttt ttt ttt	
Res		149 Ile Tyr Thr Tyr	Pro Asn	Lys Val	Phe Cys	Gly Ile	Val Ala	His Cys	Arg Gly	Asn Gln	Gly Leu
Sar		174 Leu Cys Ser His	stop								
res	679	CTC TCG TCT CAT TAG	AAG GGC	TTG CAGA	AGAAGAAGG	TGGTTCGAG	CCCTTTT	GGGTGCGGT	GATGCAAT		

En nuestro grupo se consiguió el primer sistema de producción de la forma nativa en *E. coli* usando el gen natural fusionado a un forma modificada del péptido señal de OmpA (Lacadena et al., 1994; Lacadena, 1997). Se han

utilizado dos sistemas basados en los vectores *pINPG* y *pET11b*, que permiten la producción y purificación de cantidades significativas de α -sarcina recombinante que mantiene las características estructurales y enzimáticas propias de la proteína fúngica, así como su capacidad para interaccionar con bicapas lipídicas (Lacadena, 1997). También se ha usado este sistema para la producción de gran cantidad de α -sarcina uniformemente marcada con isótopos paramagnéticos estables (^{15}N y ^{13}C), así como marcada selectivamente en Tyr y Phe con ^{15}N (Lacadena, 1997). Estas formas marcadas se han usado para, mediante RMN, resolver la estructura tridimensional en disolución de la α -sarcina (Campos-Olivas et al., 1996a y b; Pérez-Cañadillas et al., 2000). Estos sistemas se están utilizando de forma habitual en nuestro laboratorio para la producción de formas mutantes de la α -sarcina (Lacadena, 1997; Lacadena et al., 1995a y 1999; Pérez-Cañadillas et al., 1998). Una última mejora en ese sistema ha supuesto la coexpresión con tiorredoxina (utilizando el vector *pT-Trx*; Yasukawa et al., 1995), lo que permite aumentar la solubilidad de la proteína al facilitarse la reordenación de los puentes disulfuro incorrectamente formados. De esta forma se ha aumentado entre 3 y 4 veces el rendimiento en la producción, obteniéndose hasta 10 mg/l, sin modificarse las características de la proteína obtenida (García-Ortega et al., 2000).

También la mitogilina ha sido clonada y producida en *E. coli* (Better et al., 1992). En este caso el sistema utilizado consistió en el clonaje del correspondiente cDNA sintetizado químicamente en el vector *pINPG1500* (Better et al., 1988), de forma que se fusionara con la secuencia señal de *pelB*, bajo el control del promotor *araB*, inducible por L-arabinosa, obteniéndose la proteína en el medio extracelular. Este sistema también se ha usado para la producción eficaz de mutantes (Better et al., 1992; Kao y Davies, 1995 y 1999; Kao et al., 1998). La ventaja que presenta este sistema es que consigue exportar la proteína al medio extracelular, en vez de acumularse en el espacio periplásmico, por lo que la purificación resulta mucho más fácil.

La restrictocina ha sido producida asimismo en *E. coli*, fusionada a una cola de seis His, lo que permite su purificación mediante cromatografía de afinidad frente a Ni^{2+} (Moser et al., 1992). También se ha descrito la producción la proteína sin modificar en *E. coli*, una vez más usando el péptido señal de *OmpA* (Rathore et al., 1996), sistema que se ha usado igualmente para producir α -sarcina (Rathore et al., 1997). Los autores del trabajo mantienen que obtienen la proteínas puras y nativas, resolubilizándolas a partir de cuerpos de inclusión, con un rendimiento de 45 mg/l de cultivo. Sin embargo, la caracterización que presentan de las proteínas hace pensar que sólo una parte de la proteína total que obtienen está correctamente plegada y activa. Cuando se ha intentado hacer lo mismo con la α -sarcina en nuestro laboratorio,

produciéndola, purificándola y solubilizándola a partir de los cuerpos de inclusión, en similares condiciones, no se ha conseguido obtener la proteína totalmente plegada en su estructura nativa (Lacadena, 1997).

Tabla 5: Esquema de los diferentes sistemas de expresión recombinante de ribotoxinas fúngicas.

Ribotoxina	Organismo	Plásmido	Construcción	Rdto. ^a	Referencia
α -sarcina	<i>E. coli</i> RB791	pINPG (pINHIIOmpA1)	pINPG α S	1,5 - 2,0	Lacadena et al., 1994
	<i>E. coli</i> RB791	pINPG-pT-Trx	pINPG α S	>10	García-Ortega et al., 2000
	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pET11b	pET11b α S	1,5 - 2,0	Lacadena et al., 1994
	<i>E. coli</i> MV1190	pINHIIOmpA2	pINHIIOmpA2-pre α S	Ac.	Henze et al., 1990
	<i>E. coli</i> JM109	pK1N2-2	pUSAR1B15-5	0,65	Oka et al., 1992
	<i>E. coli</i> TG2	pINHIIOmpA2	pINHIIOmpA2-pre α S	5	Sylvester et al., 1997
	<i>E. coli</i> HB101	pEZZ18	pMRS75	40	Parente et al., 1998
	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pVex11	pSar	45 ^b , 2-3 ^c	Rathore et al., 1997
	<i>A. niger</i> ATCC16404	pAN7-1	pANSAR1-15	0,2	Wnendt et al., 1993
Restrictocina	<i>A. nidulans</i> CS 2008	pFB39	pFB39c1	Ac.	Lamy y Davies, 1991
	<i>A. nidulans</i> WI	pAA1	pAA-Gres	0,2	Brandhorst et al., 1994
	<i>A. niger</i> ATCC 10864	pAA1	pAA-Gres	0,3	Brandhorst et al., 1994
	<i>S. cerevisiae</i>	YCpGal:Rib	YCpRY ₃	Ac.	Yang y Kenealy, 1992
	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	pVex11	pRest	45 ^b	Rathore et al., 1996
Mitogilina	<i>E. coli</i> W3110	pINPG1500	pINPG3522	1,0	Better et al., 1992
AspFl	<i>E. coli</i> M15	p6xHis-DHFRS(0)	p6xHis-DHFRS(0)-aspfl	No hay datos	Moser et al., 1992
Clavina	<i>E. coli</i> HB101	pEZZ18	pMRS116	30-40	Parente et al., 1996

^a Rendimiento de proteína nativa en mg/l de medio de cultivo. Ac.: detección sólo por anticuerpos.

^b Rendimiento obtenido de la fracción insoluble.

^c Rendimiento obtenido de la fracción soluble.

La última ribotoxina producida en *E. coli* ha sido la clavina, utilizando el vector pEZZ18 (comercializado por Pharmacia), produciéndola como

proteína de fusión con un dominio sintético de unión a IgG (Parente et al., 1996). De esta forma, la proteína de fusión secretada al periplasma se purifica mediante cromatografía de afinidad en IgG-sefarosa, liberándose la clavina por digestión con el factor Xa, obteniéndose un rendimiento de 30-40 mg/ de cultivo. Sin embargo, hay que destacar que la clavina purificada por este sistema presenta una Thr adicional en el extremo amino, además de que los resultados obtenidos no se han podido comparar con la proteína nativa, al no haberse purificado a partir de su fuente natural, el hongo *A. clavatus* (Parente et al., 1996). Este mismo esquema se ha usado para producir la α -sarcina de forma similar, y tiene parecida actividad a la α -sarcina natural, pero no describen la caracterización estructural (Parente et al., 1998).

En cuanto a la producción heteróloga de ribotoxinas en sistemas eucariotas, los resultados han sido muy diversos. Respecto a la α -sarcina, hasta los estudios que se incluyen en esta Memoria, sólo se había introducido el gen *sar*, incluido su intrón, en *A. niger* (Wendt et al., 1993). Este resultado, sin embargo, no fue muy satisfactorio pues los autores únicamente lograron un clon productor de α -sarcina y con un rendimiento muy bajo, alrededor de tres órdenes de magnitud menor que en el *A. giganteus* original.

Lamy y Davies (1991) también intentaron producir la restrictocina en otro hongo del mismo género, *A. nidulans*, utilizando como marcador el gen *argB*, mutado en la cepa huésped, CS 2008. También el grupo de Ron Kenealy intentó lo mismo, tanto en *A. nidulans* como en *A. niger* (Brandhorst et al., 1994), usando construcciones parecidas. En los tres intentos, sin embargo, los niveles de producción fueron muy escasos.

El mismo grupo de Kenealy intentó la producción de restrictocina recombinante en *Saccharomyces cerevisiae* (Yang y Kenealy, 1992a), pero no se consiguió por la ineficiencia del sistema de secreción, como se discute más adelante, por lo que sólo obtuvieron la producción de mutantes inactivos.

Modelización y determinación de su estructura

Desde que se determinó la estructura primaria de la α -sarcina se observó la gran similitud de secuencia que presentaba con otras RNAsas microbianas como la T1 o la U2 (Sacco et al., 1983), lo que hacía pensar que podía presentar también una estructura tridimensional similar. Se conocía la de la RNasaT1, además de numerosas características relacionadas con su conformación, configuración del centro activo y mecanismo de plegamiento (Campbell y Ts'o, 1971; Heineman et al., 1980; Heinemann y Saenger, 1982;

Ding *et al.*, 1991; Grunert *et al.*, 1991; Grauzin *et al.*, 1992). Se conocían también las estructuras tridimensionales de otras dos proteínas de la misma familia, las RNasas Ms (Nonaka *et al.*, 1993) y F1 (Vassilyev *et al.*, 1993) apareciendo posteriormente la de la RNasa U2 (Noguchi *et al.*, 1995), que es aquella cuya secuencia presenta mayor grado de identidad con respecto a la α -sarcina.

Se vio que las similitudes de secuencia se concentraban en algunas zonas que correspondían a los residuos del centro catalítico y las hebras β de la lámina principal de las RNasas de la familia de la T1 y que, comprendidas entre estas hebras, las ribotoxinas presentaban secuencias más largas que las otras RNasas y ricas en residuos básicos (Martínez del Pozo *et al.*, 1988; Lamy *et al.*, 1992; Mancheño *et al.*, 1995a). Según este alineamiento, se propuso que las ribotoxinas presentarían un mismo patrón de plegamiento en torno a una lámina β central bastante hidrofóbica en la que se situarían los residuos catalíticos. Esta lámina se predijo con al menos cuatro hebras, y explicaría el componente hidrofóbico de la interacción con vesículas lipídicas. Los residuos extra con respecto a las RNasas menos específicas serían lazos en los que abundarían giros β o estructuras no ordenadas, y en los cuales se encuentran la mayoría de los residuos básicos de la proteína, y serían los responsables del componente electrostático de la interacción con vesículas (Mancheño *et al.*, 1995a). Al mismo tiempo, Kao y Davies (1995) publicaron un trabajo en el que postulaban una estructura similar para la restrictocina, basándose en un alineamiento similar, aunque centrando su explicación en la especificidad de la actividad ribonucleolítica de las ribotoxinas, de la que también responsabilizaban a los lazos extra.

La colaboración de nuestro grupo con el Grupo de Espectroscopía de RMN del Instituto de Estructura de la Materia (CSIC, Madrid) ha permitido determinar, tras varios años de esfuerzo, la estructura tridimensional de la α -sarcina, mejorando sucesivamente la resolución y refinando la estructura hasta resolver incluso las zonas que aparentan estar más desordenadas (Campos-Olivas *et al.*, 1996a y b; Campos-Olivas, 1997; Pérez-Cañadillas, 1999; Pérez-Cañadillas *et al.*, 1998 y 2000). Para ello se ha necesitado no sólo la producción y purificación de suficiente cantidad de α -sarcina nativa, sino también formas marcadas, uniformemente y en algunos residuos, con isótopos estables paramagnéticos, como ya se ha comentado. Durante este tiempo, se ha publicado asimismo la estructura de la restrictocina, resuelta mediante difracción de rayos X (Yang y Moffat, 1996).

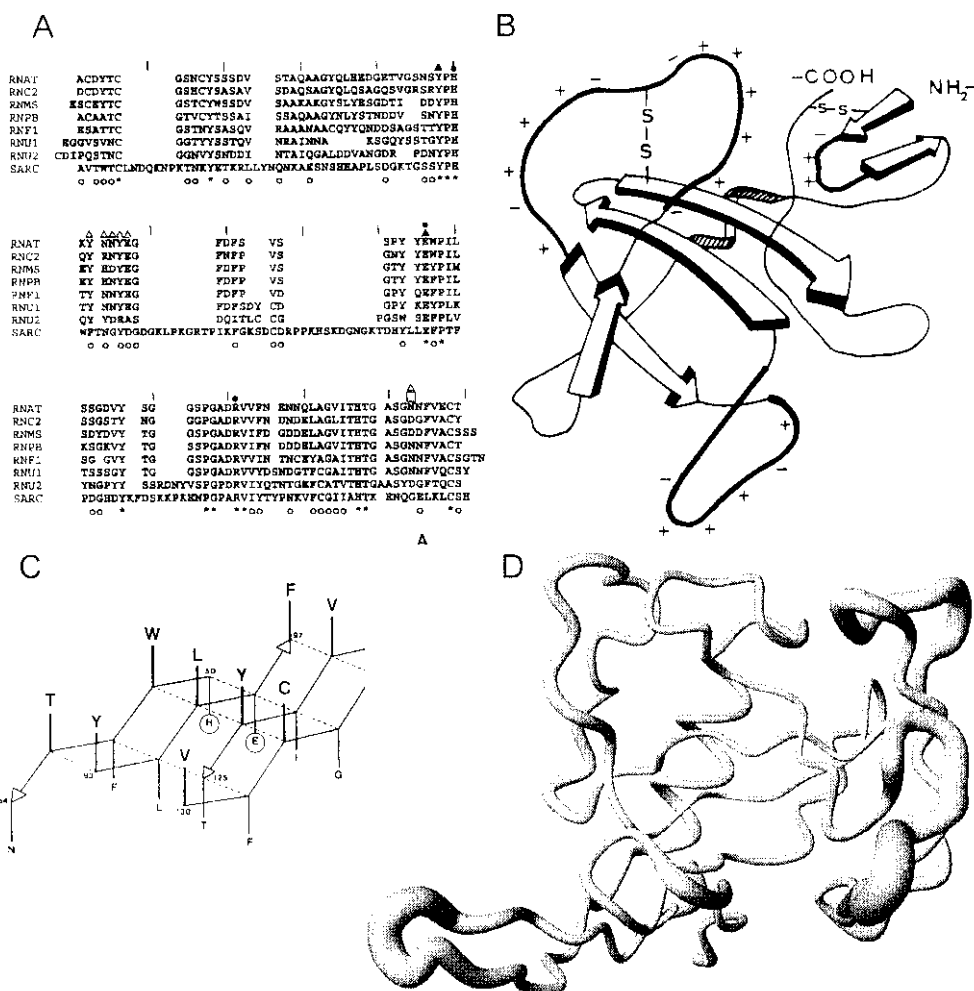


Figura 8: La estructura tridimensional de la α -sarcina: de la modelización a la determinación. **A:** Alineamiento de la α -sarcina y otras RNAsas fúngicas de las superfamilia de la T1 (Mancheño et al., 1995a), del que se dedujo la similitud de los elementos de estructura secundaria regular ordenada. **B:** Modelo estructural general de la α -sarcina (Gasset, 1990; Mancheño et al., 1994a), elaborado a partir de los elementos comunes con la RNasa T1. **C:** Predicción detallada de los residuos mínimos de la lámina β central (Mancheño et al., 1995a). **D:** Representación en «tubo» del esqueleto de la estructura tridimensional en disolución de la α -sarcina (Pérez-Cañadillas, 1999; Pérez-Cañadillas et al., 2000). El grosor del tubo es proporcional a la desviación media entre las coordenadas de los átomos iguales.

La estructura de la α -sarcina en disolución, está representada por un conjunto de 47 conformeros (Pérez Cañadillas, 1999). Su plegamiento global corresponde, como se había predicho, a una estructura de tipo α/β formada por

una lámina antiparalela de 5 hebras (β_3 a β_7), conectadas con topología -1, -1, -1, -1. Empaquetada frente a la lámina se encuentra una hélice α de aproximadamente tres giros (α_1). El extremo amino de 26 residuos forma una larga horquilla β en la que las dos hebras se pueden considerar partidas por una «bisagra» que separaría dos pequeñas láminas. El resto de los residuos formaría cinco largos bucles, que son los que conectan los elementos de estructura secundaria regular. De ellos, al menos el bucle 2 puede considerarse separado en dos partes, 2_A y 2_B , separadas por un giro de hélice, α_2 (Pérez Cañadillas, 1999).

Tabla 6: Comparación de la nomenclatura y los residuos que integran cada uno de los elementos de estructura secundaria en la restrictocina (según su estructura en cristal por Yang y Moffat, 1996) y la α -sarcina (según su estructura obtenida por RMN por Pérez Cañadillas, 1999, y Pérez-Cañadillas et al., 2000). Los residuos que no aparecen en la α -sarcina corresponden a la transición entre dos elementos consecutivos. Se indican los colores utilizados en las figuras; si no se indica, es azul oscuro.

RESTRICTOCINA		α -SARCINA		Color
Residuos	Elemento	Residuos	Elemento	
36169	B1	36196	β_{1A}	
		36414	β_{1B}	
36479	L1	36540	giro β_1	
17-24	B2	17-20	β_{2A}	
		23-26	β_{2B}	
25-35	H1	27-36	α_1	rojo
36-48	L2	37-49	bucle 1	amarillo
49-52	B3	50-52	β_3	
53-91	L3	53-72	bucle 2_A	verde
73-77	H2	73-78	α_2	verde
53-91	L3	79-93	bucle 2_B	verde
92-98	B4	94-97	β_4	
99-117	L4	98-119	bucle 3	azul claro
118-125	B5	120-124	β_5	
126-131	L5	125-132	bucle 4	rosa
132-137	B6	133-137	β_6	
138-142	L6	139-143	bucle 5	naranja
143-147	B7	144-146	β_7	

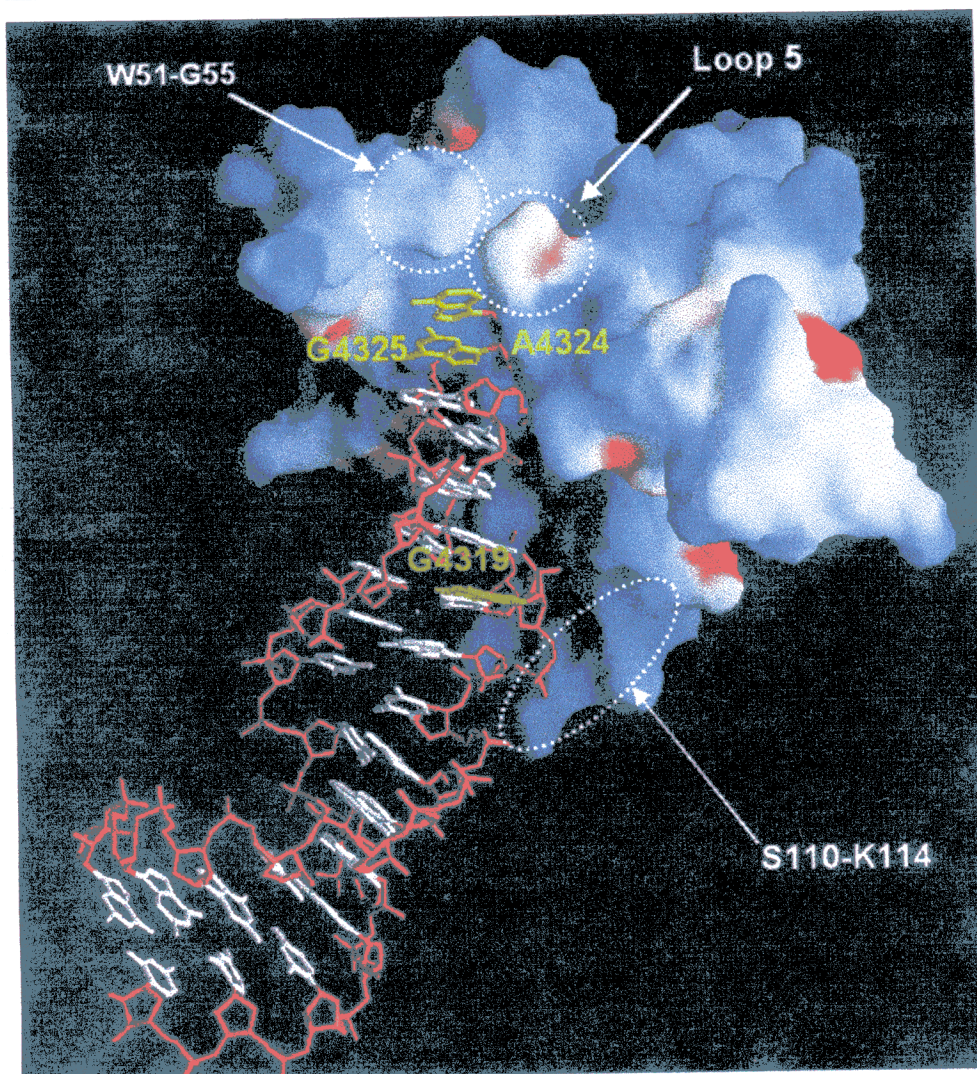


Figura 9: Modelo de interacción del SRL con la α -sarcina, tomado de Pérez-Cañadillas (1999) y Pérez-Cañadillas et al. (2000). La proteína se representa mediante su superficie electrostática, y el RNA en modelo de varillas. El esqueleto fosfodiéster del RNA se representa en rojo y las bases en blanco, a excepción de la G de reconocimiento (en verde) y las bases adyacentes al sitio de corte (amarillo). Se indican además los residuos de la proteína que podrían estar directamente implicados en la interacción. *Loop 5*: bucle 5.

El plegamiento de la α -sarcina es muy similar al de la restrictocina, con los elementos de estructura secundaria regular prácticamente idénticos. Sólo se aprecian orientaciones ligeramente diferentes en las regiones correspondientes a Ser 83-Asp 91 de la α -sarcina y el bucle 5, aunque la región homóloga a Ser 83-Asp 91 forma contactos intermoleculares en el dímero cristalográfico de la restrictocina. En cuanto al centro activo de ambas proteínas, es muy similar, y sólo se diferencian en la orientación de la cadena lateral de la arginina (121 en

la α -sarcina y 120 en la restrictocina), probablemente debido a la presencia de un ion fosfato en la estructura cristalográfica. Hay que destacar que una parte de la horquilla β del extremo amino no ha podido ser resuelta en el cristal de la restrictocina, por lo que no se tiene información sobre esta zona. Esta zona presenta una gran flexibilidad en los confórmeros de la α -sarcina (figura 8 D), y sí ha podido ser descrita (Pérez Cañadillas, 1999; Pérez-Cañadillas et al., 2000).

En cuanto a la comparación con las estructuras de las RNasas T1 y U2, las ribotoxinas muestran altos grados de similitud para las regiones de estructura secundaria regular (aunque la hélice de las ribotoxinas es menor), centrándose las principales diferencias en la menor longitud de los bucles de conexión y de la horquilla β , que en las ribotoxinas (al menos en la α -sarcina) presenta una sublámina adicional. Los residuos catalíticos de las tres enzimas se encuentran en posiciones equivalentes, con una ligera diferencia en cuanto a la cadena lateral de la arginina. La diferente actividad ribonucleolítica se puede tratar de explicar por la distinta orientación del bucle 5 y de los cambios en el sitio de reconocimiento de la base, y por la menor accesibilidad de la histidina catalítica de las ribotoxinas, que justifica su menor eficacia catalítica frente a nucleótidos (Pérez Cañadillas, 1999; Pérez-Cañadillas et al., 2000).

La producción de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*

La levadura *Pichia pastoris* es un microbio eucariota que ha sido utilizado para desarrollar un eficiente sistema de producción de proteínas heterólogas, comercializado desde hace unos años por Invitrogen (Cregg y Madden, 1988; Siegel y Brierly, 1989; Romanos et al., 1992; Cregg et al., 1993; Higgins y Cregg, 1998). Paralelamente, se ha desarrollado un sistema similar, aunque con características levemente distintas, por parte del Centro Nacional de Biotecnología de Cuba (Herrera et al., 1991). Metodológicamente, este sistema es casi tan sencillo de manejar como *E. coli* y tiene ventajas adicionales sobre este procarionte, como la de llevar a cabo diferentes modificaciones postraduccionales. Además, es más rápido, fácil y económico que otros sistemas eucariotas, como el de baculovirus, o el de *Saccharomyces cerevisiae* y suele dar mucho mejores niveles de expresión. En este sentido, aunque las manipulaciones genéticas y moleculares que se necesitan son muy similares a las de *Saccharomyces cerevisiae*, suelen obtenerse rendimientos entre 10 y 100 veces mayores.

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica. Representa uno de los cuatro géneros que reúnen esta característica, siendo los otros tres *Candida*, *Hansenula* y *Torulopsis*. Por tanto, es capaz de metabolizar metanol como fuente única de carbono. Este detalle es muy importante, pues en él se basa todo el sistema desarrollado. El primer paso en la metabolización del metanol es su oxidación a formaldehído, proceso que lleva a cabo la alcohol oxidasa. El gen que regula la expresión de esta alcohol oxidasa, *AOX1* (Ellis et al., 1985), se encuentra muy estrictamente regulado. En ausencia de metanol, los niveles basales de expresión son ínfimos, y se produce una gran cantidad de la enzima al añadir el metabolito; de forma que, usando metanol como única fuente de carbono, la alcohol oxidasa puede llegar a representar más del 30% de toda la proteína soluble presente en *Pichia pastoris* (Couderc y Baratti, 1980). La expresión del gen *AOX1* se controla a nivel de la transcripción. Esto es así hasta tal punto que en presencia de metanol el 5% del mRNA total presente en las células corresponde a la alcohol oxidasa (Cregg y Madden, 1988). Este control se ejerce según un mecanismo mixto de represión/desrepresión, de forma que no es suficiente la ausencia de un catabolito represor (glucosa, por ejemplo) para que haya expresión significativa, sino que además es necesaria la presencia del inductor, el metanol en este caso (Tschopp et al., 1987a).

Estas propiedades del metabolismo de *P. pastoris* son las que han sido utilizadas para diseñar el sistema de expresión que nos ocupa. Así, se utiliza como huésped la cepa GS115 (Cregg et al., 1985), que tiene un defecto en el gen de la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*) que le impide crecer en medios mínimos, si no se le suplementa His. Los vectores de expresión utilizan esta característica al incorporar el alelo correcto de este gen, además de los extremos 5' y 3' del gen *AOX1* (véase el apartado de materiales). El fragmento del extremo 5' es de unos 1000 pb, y contiene la región promotora del gen. De esta forma, si se inserta el gen foráneo en la posición adecuada, se obtiene una construcción en la cual queda bajo el control de dicho promotor (Romanos et al., 1992). Una vez que se introduce en *P. pastoris* GS115, sólo crecerán en un medio mínimo carente de His aquellas cepas que hayan incorporado el gen *HIS4* que porta el plásmido. Si además se ha integrado adecuadamente, el fragmento flanqueado por los extremos del gen *AOX1*, que contiene el gen foráneo, reemplazará al gen de la alcohol oxidasa, de forma que estas cepas no podrán crecer en un medio mínimo que incorpore metanol como única fuente de carbono.

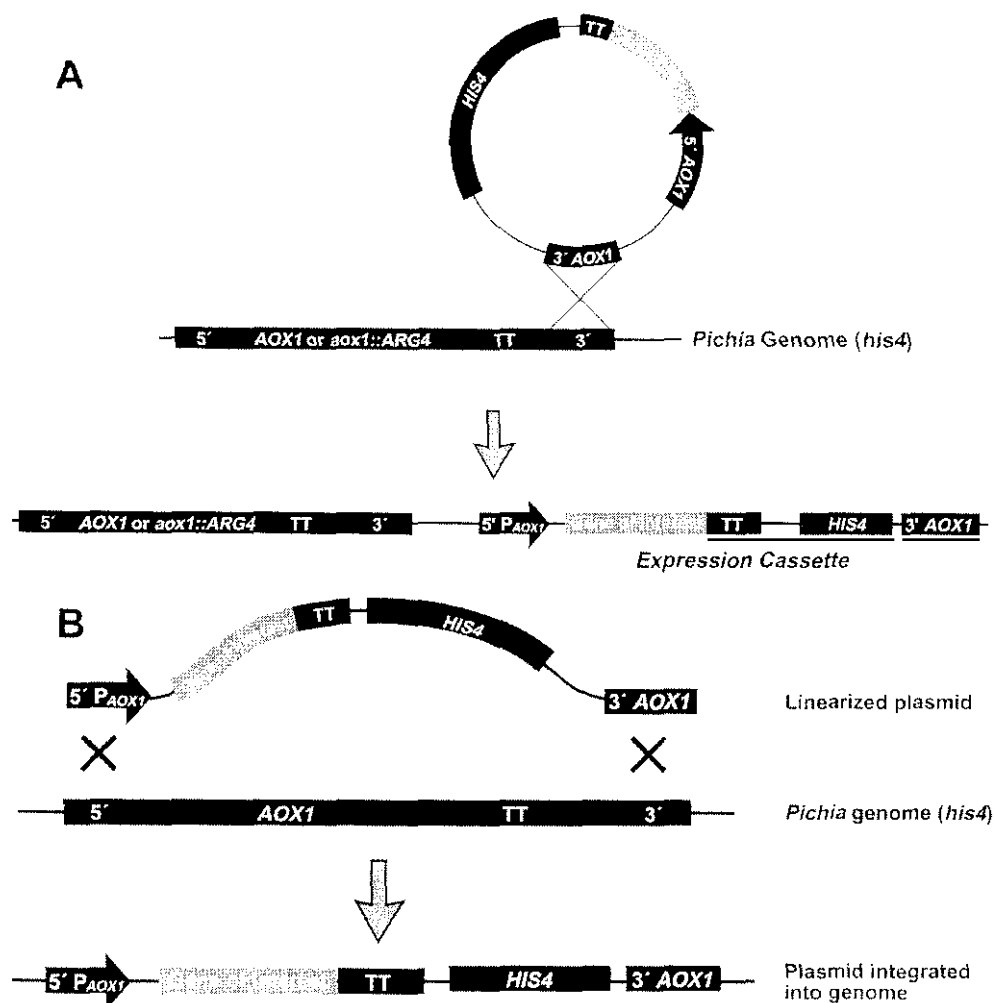


Figura 10: Mecanismos de recombinación para la integración del vector de expresión en el locus *AOX1* de *P. pastoris* (tomado del manual de Invitrogen). **A:** Inserción de un plásmido circular por recombinación simple, produciéndose una duplicación del gen. **B:** Reemplazamiento génico por recombinación doble, favorecido por el fragmento lineal con extremos recombinantes; esta es la estrategia que se ha utilizado.

Este tipo de construcciones se han empleado para producir proteínas, tanto intracelularmente como por secreción. En este segundo caso, se utiliza un vector que permita fusionar el DNA foráneo con el del péptido señal de una proteína extracelular de *Pichia* (Tschopp et al., 1987b), o bien se utiliza un DNA que codifique una preproteína cuyo péptido señal sea reconocido por la levadura (Yamada et al., 1994; Clare et al., 1991b). Todo ello ha permitido expresar y producir muchas proteínas heterólogas, algunas de ellas en altísimas concentraciones (tabla 7).

Tabla 7: Algunas proteínas heterólogas producidas en *Pichia pastoris*.

Proteína (organismo)	Modo	% de proteína	Cantidad (g/l)	Referencia
β-galactosidasa	I	20	ND	Cregg et al., 1988
Factor de necrosis tumoral (TNF)	I	25	8,0	Digan et al., 1989
Antígeno de superficie de la hepatitis B	I	3	0,30	Cregg et al., 1987
Superóxido dismutasa (SOD)	I	2	0,75	
Interleukina-2 humana	I	30	4,0	
Fragmento C de la toxina del tétanos	I	27	12	Clare et al., 1991
Pertactina (P69)	I	10	3,0	Romanos et al., 1991
Invertasa	S	80	2,5	Tschopp et al., 1987b
Lisozima bovina	S	60	0,30	Digan et al., 1989
Lisozima humana	S	ND	0,70	
Albúmina de suero humano	S	ND	4,0	Ikegaya et al., 1997
Factor de crecimiento epidérmico (EGF) humano	S	80	0,50	Siegel et al., 1990
Factor de crecimiento epidérmico (EGF) de ratón	S	80	0,45	Clare et al., 1991
Factor-1 de crecimiento análogo de la insulina, humano	S	ND	0,50	
Interleukina-2 humana	S	ND	1,0	
Análogo de la aprotinina	S	ND	0,80	Vedvick et al., 1991
Inhibidor de la proteasa de Kunitz	S	ND	1,0	Wagner et al., 1992
Gelatina no hidroxilada	S	ND	14,8	Werten et al., 1999
Catepsina E humana	S	ND	IT	Yamada et al., 1994

I: intracelular; S: secretada.

ND: no disponible; IT: detectable sólo por inmunotransferencia.

Si no hay referencia, consultar Cregg et al., 1993.

OBJETIVOS

El estudio de las relaciones estructura-función de las ribotoxinas fúngicas es el objeto principal de estudio de esta Tesis, enmarcada en la línea de investigación de nuestro grupo. Las ribotoxinas pertenecen a la superfamilia de las ribonucleasas microbianas extracelulares, encabezada por la RNasa T1. Habrían evolucionado a partir de un gen de esta superfamilia, adquiriendo funciones más especializadas, localizadas todas ellas en una estructura relativamente pequeña, y que les confieren su citotoxicidad: la exquisita especificidad de sustrato, dirigida a un solo enlace del ribosoma, y la capacidad de entrar en las células atravesando membranas lipídicas, que es donde reside la selectividad de la acción citotóxica.

Un primer objetivo de la Tesis se planteó dentro de esta hipótesis evolutiva: estudiar la extensión de las ribotoxinas entre los hongos filamentosos, intentando estudiar asimismo las relaciones evolutivas que pudiera haber entre ellas y con las ribonucleasas no citotóxicas, su posible evolución y cómo habrían ido adquiriendo los elementos que les permitieran adquirir las funciones específicas.

Entre estas funciones, nuestro grupo había estudiado con detalle la capacidad de la α -sarcina para atravesar membranas, una de las propiedades exclusivas de las ribotoxinas respecto al resto de la superfamilia, obteniéndose importantes conclusiones. Sin embargo, el grupo se había ocupado menos de otras cuestiones, que han sido también objetivos de esta Tesis.

Se ha estudiado su mecanismo de producción y secreción. Para ello, se ha abordado la clonación y producción heteróloga de la α -sarcina en un sistema eucariota fácilmente manipulable y suficientemente parecido al género *Aspergillus*, optando por la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. De esta forma, se ha podido estudiar el procesamiento del precursor de la α -sarcina, así como el papel de sus distintas formas.

Como el mecanismo de secreción debe ser común a otras toxinas proteicas en los hongos *Aspergilli*, también se planteó estudiar la producción y secreción de otra de ellas, la proteína antifúngica (AFP), para lo cual había que llevar a cabo, además, una caracterización detallada de este polipéptido, que estaba muy poco estudiado.

Las características estructurales que confieren a la α -sarcina su actividad ribonucleolítica apenas se habían caracterizado hasta la fecha, pues simplemente se había asumido su similitud con la RNasa T1. Sin embargo, la especificidad de las funciones de las ribotoxinas hacía interesante estudiarlo en detalle para ver las diferencias que pudiera tener con el de las RNasas no citotóxicas. Han convergido en este estudio distintos trabajos: la producción de formas mutantes en *Escherichia coli*, la optimización de un ensayo cuantitativo, la resolución de la estructura tridimensional mediante RMN y la determinación por la misma técnica de los pK_a de los residuos ionizables. Estos dos últimos aspectos no han sido objeto del trabajo de esta Tesis, pero los resultados obtenidos por el Grupo de RMN del Instituto de Estructura de la Materia (CSIC) han sido clave a la hora de interpretar los presentados en esta Memoria.

Por último, se ha iniciado la comparación directa, siempre dentro de la perspectiva de la relación estructura-función, entre las ribotoxinas y las ribonucleasas microbianas no citotóxicas. Lo que se pretende, en definitiva, es delimitar con exactitud los elementos responsables de las funciones específicas. Para ello, se pretende obtener proteínas quiméricas híbridas entre las ribonucleasas no citotóxicas y las ribotoxinas. Esto se podría hacer con la RNasa T1, la más estudiada, pero es mejor hacerlo con otra ribonucleasa más cercana en su estructura a las ribotoxinas, la RNasa U2 de *Ustilago sphaerogena*. Por tanto, se ha abordado la clonación de su gen y la producción heteróloga de esta proteína en sistemas en los que se pudiera manipular fácilmente y obtener, en un futuro próximo, formas mutadas y quiméricas de esta proteína y de las ribotoxinas, concretamente en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*.

MATERIALES

1.- Microorganismos

Cepas de *Escherichia coli*

Cepas para la manipulación del DNA

DH5 α F': F' *endA1 hsdR17* ($r_K^- m_K^-$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (NaI^R) *relA1* Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR* [Φ 80 *dlac* Δ (*lacZ*) M15]

HB101: F' Δ (*gpt-proA*) 62 *leuB6 supE44 ara-14 galK2 lacY1* Δ (*mcrC-mrr*) *rpsL20* (Str^r) *xyl-5 mtl-1 recA13*

TG1: F' *traD36 lacI^q* Δ (*lacZ*) M15 *proA⁻B+/supE* Δ (*hsdM-mcrB*)5 ($r_K^- m_K^+$ McrB⁻) *thi* Δ (*lac-proAB*)

INV α F': F' *endA1 hsdR17* ($r_K^- m_K^-$) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1* Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 λ^-

Cepas para la expresión de genes plasmídicos

BL21(DE3): F' *ompT [lon] hsd_B* ($r_B^- m_B^-$; cepa tipo B de *E. coli*) con DE3, profago λ que contiene el gen de la RNA polimerasa de T7.

JA221: F' *hsdR lacY leuB trpE5 recA1* λ^-

RB791: W3110 *lacI^q* L8

W3110: LAM⁻ IN(*rrnD-rrnE*)1 *rph-1*

Cepas para mutagénesis dirigida por oligonucleotido

BW313: *HfrKL16 po/45 [lysA (61-62)] dut1 ung1 thi1 relA1*

TG1: F' *traD36 lacI^q* Δ (*lacZ*) M15 *proA⁺B-/supE* Δ (*hsdM-mcrB*)5 ($r_K^- m_K^+$ McrB⁻) *thi* Δ (*lac-proAB*)

Cepas de *Pichia pastoris*

Se ha usado la cepa GS115 (Invitrogen, Inc.), que presenta una mutación en el gen *HIS4* (genotipo *his4*), que codifica la histidinol deshidrogenasa, una enzima implicada en la biosíntesis de histidina. Esto permite transformarla con plásmidos que contengan una copia correcta de *HIS4*, seleccionándose los transformantes en medio mínimo carente de histidina.

Asimismo, se han usado dos cepas, que proporciona Invitrogen, y que son producto de la transformación de GS115 con sendos vectores que incorporan genes heterólogos. Una de ellas, de fenotipo His⁺ Mut^s produce albúmina extracelularmente. La otra, de fenotipo His⁺ Mut^r, produce β -galactosidasa intracelularmente. Ambas se usan como controles, tanto para la determinación del fenotipo Mut, como para la producción de proteínas.

Hongos filamentosos

Producción de α -sarcina y AFP

Se ha usado la cepa MDH 18894 de *Aspergillus giganteus*, suministrada en el año 1988 por el Dr. Y. Endo, de la Universidad de Ehime (Japón).

Detección de ribotoxinas

Principalmente, se han usado cepas del género *Aspergillus*. Éstas, así como las de otros géneros de hongos filamentosos relacionados, se detallan en la tabla 8, donde también se especifica su origen.

Las cepas se crecieron en placas de PDA a partir de esporas congeladas o conservadas en gel de sílice, o de cultivos en agar cubiertos con aceite de vaselina. Las características morfológicas de las distintas especies fueron comprobadas por la Dra. Barbara Dill, del *Department of Microbiology and Immunology* de la *University of British Columbia* (Vancouver, Canadá).

Cepas de *Ustilago*

Durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Julian Davies, en Vancouver, se pidió la cepa ATCC 12421 de *Ustilago sphaerogena* Burrill a la propia ATCC. Esta cepa es la misma que utilizaron Rushizky et al. (1970) cuando describieron la purificación de una ribonucleasa, que coincidía con la RNasa U2 purificada por Arima et al. (1968a). De esta cepa se extrajo el DNA

Tabla 8: Cepas de hongos filamentosos utilizadas.

Cepa		Origen
T1	1. <i>Aspergillus giganteus</i>	MDH 18894
J06	2. <i>Aspergillus giganteus</i>	NRRL 10
J08	3. <i>Aspergillus giganteus</i>	NRRL 1780
J10	4. <i>Aspergillus giganteus</i>	NRRL 4763
N05	5. <i>Aspergillus viridinitans</i>	
N01	6. <i>Aspergillus fumigatus</i>	
A08	7. <i>Aspergillus sp.</i>	
A09	8. <i>Aspergillus sp.</i>	
J18	9. <i>Aspergillus fischeri</i>	
J14	10. <i>Aspergillus restrictus</i>	MDH 13462L
J21	11. <i>Aspergillus glaucus</i>	
N03	12. <i>Neosartorya glabra</i>	
J15	13. <i>Aspergillus nidulans</i>	(CS2008)
J22	14. <i>Aspergillus flavus</i>	
J09	15. <i>Aspergillus oryzae</i>	NRRL 447
J13	16. <i>Aspergillus niger</i>	
J11	17. <i>Aspergillus alutaceus</i>	NRRL 398
J20	18. <i>Aspergillus terreus</i>	
N07	19. <i>Hemicarpenateles acanthosporus</i>	
P53	20. <i>Penicillium notatum</i>	
P61	21. <i>Penicillium italicum</i>	

Origen: 1, donación del Dr. Yaeta Endo a nuestro laboratorio.
 2, aportación de la NRRL al Dr. Julian Davies (UBC, Vancouver, Canadá).
 3, colección particular del Dr. Julian Davies.
 4, colección particular de la Dra. Barbara Dill (UBC, Vancouver, Canadá).

genómico y el RNA con el que se sintetizó el cDNA. Esta cepa se creció en PDA y se comprobó que su morfología era la habitual en un hongo *Ustilago* con la ayuda del Dr. James Kronstad, de la UBC. Ya en Madrid, se pidió al CBS la cepa CBS 534.71, que es equivalente a la ATCC 12421. De esta cepa se purificó la RNasa U2 silvestre que se ha estudiado.

El Dr. Kronstad suministró una cepa de *U. maydis* de la colección de la UBC que, simplemente, se usó en algunos experimentos como control de los realizados con *U. sphaerogena*.

2.- Vectores plasmídicos

Vectores para la manipulación del DNA

pUC18 y pUC19: Estos vectores se utilizaron para la simple clonación de genes y su secuenciación. Las secuencias de hibridación de los

que flanqueando a la zona de multiclonaje posee secuencias de hibridación con los oligonucleótidos habituales de secuenciación.

Vectores para la producción de proteínas en *E. coli*

pINIII OmpA2: La serie de vectores pINIII OmpA utilizan un promotor de fusión entre los de *lpp* y *lac*, inducible por IPTG, junto con el gen represor *lacI* (Ghrayeb et al., 1984). Además, incorporan la secuencia señal de la proteína extracelular OmpA de *E. coli*, para así secretar la proteína fusionada al espacio periplásmico. Se ha usado para producir de esta forma la RNasa U2.

pINPG: Este vector es una modificación del vector pINIII OmpA1 (Ghrayeb et al., 1984), construido por el Dr. J.L. Barbero (Farmacia). En este vector, los aminoácidos Val 18 y Gln 20 del péptido señal de la proteína OmpA han sido sustituidos por Ser y Leu, respectivamente. Se ha utilizado para producir la α -sarcina en el espacio periplásmico, con este vector únicamente (Lacadena et al., 1994) o combinado con pT-Trx, un plásmido que produce tiorredoxina, lo que permite aumentar la producción de proteína correctamente plegada (García-Ortega et al., 2000).

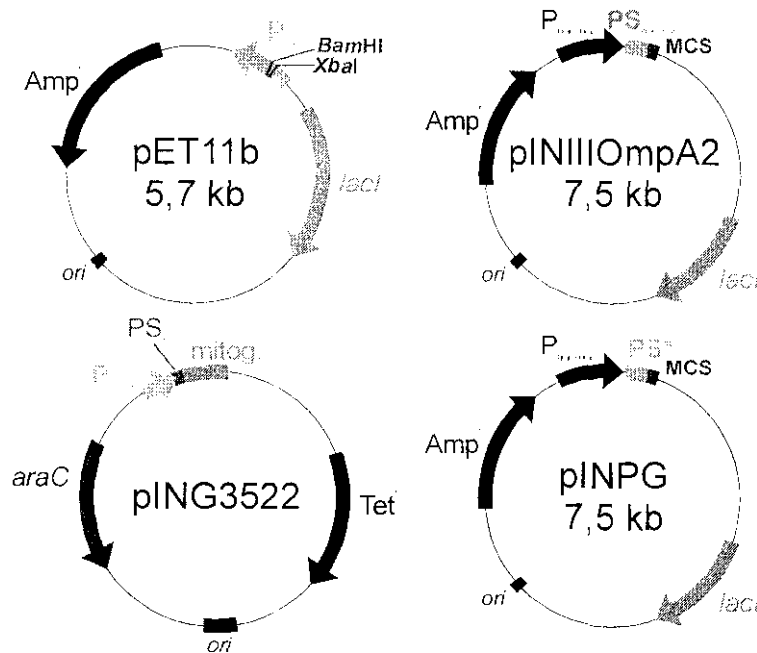


Figura 12: Plásmidos utilizados en la producción de proteínas en *E. coli*. PS: péptido señal. PS*: péptido señal de OmpA modificado. P: promotor. MCS: sitio de multiclonaje. mitog.: mitoquina.

pET11b: Los genes que se clonan en los vectores pET se encuentran bajo el control del promotor del bacteriófago T7 y de las señales de traducción propias de este mismo fago (Rosenberg et al., 1987). De esta forma se elimina prácticamente la existencia de expresión basal, especialmente durante las fases de clonaje, que se pueden hacer en células que no producen la RNA polimerasa del fago T7. Para producir la proteína, se utilizan células que incorporan el gen de esta polimerasa en el cromosoma, bajo el control de un promotor *lac*, lo que permite inducir la expresión con IPTG. En este caso, se ha utilizado para la producción de α -sarcina, incorporando también la secuencia señal de OmpA modificada, proveniente del plásmido pINPG α S (Lacadena et al., 1994 y 1999).

pING3522: Este vector fue preparado por Better et al. (1992) para producir mitogilina. La expresión se controla por el promotor de *araB* y el gen regulador *araC*, ambos de *Salmonella typhimurium*, inducibles con arabinosa. Para conseguir la secreción al exterior bacteriano, la proteína se fusiona con el péptido señal de una pectato liasa (*pelB*) de *Erwinia carotovora*. Se ha utilizado para producir RNasa U2 en el medio de secreción, sustituyendo mediante PCR la secuencia de la mitogilina por la de la RNasa U2.

Vectores para la producción de proteínas en *P. pastoris*

Se han utilizado los plásmidos pHLD2, pHLS1 y pPIC9 (Invitrogen), como vectores para la integración en el genoma de *P. pastoris* de las secuencias de los genes a expresar (figura 13). Son plásmidos con secuencias de autorreplicación de *E. coli* y un gen que confiere resistencia a ampicilina, lo que permite preparar las construcciones de DNA y clonarlas utilizando esta bacteria. Tienen la región promotora y la de terminación de la transcripción (TT) del gen *AOX1*, entre las cuales está el sitio de clonaje, lo que permite colocar el gen a expresar bajo el control de dicho promotor. Incluyen también una copia completa del gen *HIS4*, que es el que se utiliza para seleccionarlo al transformar cepas *his4* de *P. pastoris*. Este gen está insertado en la zona 3' del locus *AOX1*, lo que permite que todo este *cassette* de expresión se pueda integrar en el genoma de *P. pastoris* en dicho locus mediante una doble recombinación, lo que se facilita por los sitios de restricción colocados en los extremos de este *cassette*.

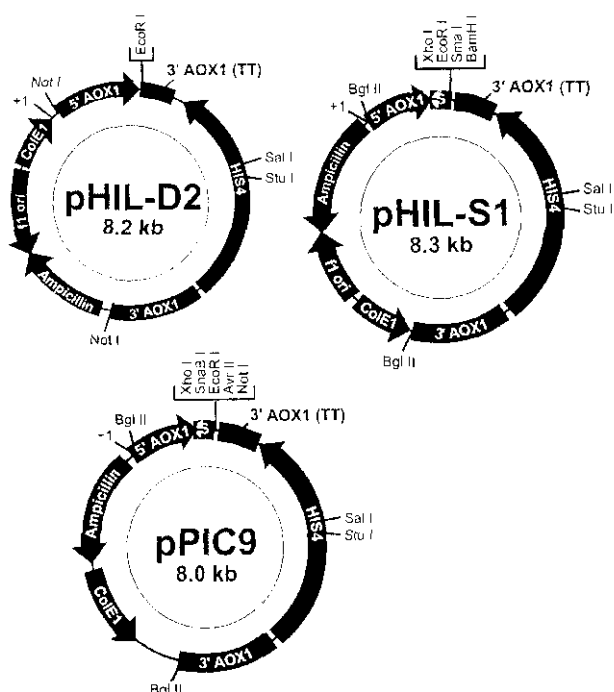


Figura 13: Vectores de expresión en *P. pastoris* (tomado del manual de Invitrogen). Las características se explican en el texto. S representa la secuencia señal o líder en pHIL-S1 y pPIC9, respectivamente.

Tienen características adicionales que los diferencian, además de los distintos sitios de restricción que se pueden utilizar:

- pHILD2 y pHILS1 tienen un origen de replicación para el fago f1, lo que permitiría la producción de DNA de cadena simple del plásmido,
- pHILS1 incorpora la secuencia señal de la fosfatasa alcalina, lo que permite la producción extracelular de la proteína heteróloga.
- pPIC9 incorpora la secuencia líder (secuencias señal y pro) del factor α de apareamiento de *Saccharomyces cerevisiae*, que también permite la eficaz secreción de la proteína heteróloga a producir.

3.- Medios de cultivo

Cultivo de *E. coli*

LB (Sambrook et al., 1989), como medio general para el mantenimiento de cepas y purificación de plásmidos a pequeña o gran escala. Asimismo se

utilizó en determinados ensayos de producción de α -sarcina. Este medio contiene 10 g/l de triptona bacteriológica, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl. El pH se ajustó a 7,0. Para prepararlo como medio sólido se añadieron 15 g/l de agar. Para la selección de transformantes de *E. coli* resistentes a algún antibiótico, se añadió éste a la concentración estándar recomendada (Sambrook et al., 1989).

YT (Sambrook et al., 1989), se utilizó para el crecimiento de cepas de *E. coli* destinadas a la obtención de ssDNA. Es un medio más rico que el LB y contiene 16 g/l de triptona bacteriológica, 10 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl, a lo que se añaden, tras autoclavar, 2 g/l de glucosa esterilizada por filtración.

Medio mínimo (Sambrook et al., 1989), se utilizó para la producción de α -sarcina recombinante y de diferentes formas mutantes. Este medio contiene 100 ml/l de la mezcla de sales M9 (Na_2HPO_4 30 g/l, KH_2PO_4 15 g/l, NaCl 2,5 g/l, NH_4Cl 5 g/l, pH 7,4; Sambrook et al., 1989), MgSO_4 1 mM, glucosa 0,2% (p/v) y CaCl_2 0,01 mM.

Medio de triptona (TB), se ha utilizado para la producción de RNasa U2 utilizando el plásmido pINGU2 en las células W3110. Contiene 5 g/l de NaCl y 10 g/l de triptona.

Ψ Broth, se utilizó para la obtención de células competentes de *E. coli* y su posterior transformación con DNA plasmídico. Contiene triptona bacteriológica 2% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), MgSO_4 0,4% (p/v) y KCl 10 mM. El pH del medio se ajustó a 7,6 utilizando KOH 4 M.

Cultivo de *P. pastoris*

Los medios utilizados para el cultivo de la levadura *Pichia pastoris*, según la finalidad de cada uno, fueron:

Crecimiento y selección de recombinantes

YPD (1 litro): 10 g de extracto de levadura,
20 g de peptona,
2 g de D-glucosa,
20 g de agar (para medio sólido).

MD (1 litro): 1,34 g de base de nitrógeno para levaduras, sin aminoácidos,

4 µg de biotina,
2 g de D-glucosa,
15 g de agar (para medio sólido).

MM (1 litro): 1,34 g de base de nitrógeno para levaduras, sin aminoácidos,

4 µg de biotina,
500 µl de metanol,
15 g de agar (para medio sólido).

Producción de proteínas

BMGY (1 litro): 10 g de extracto de levadura,

20 g de peptona,
1 ml de glicerol,
1,34 g de base de nitrógeno para levaduras, sin aminoácidos,
4 µg de biotina,
0,1 M fosfato de potasio, pH 6,0.

BMMY (1 litro): 10 g de extracto de levadura,

20 g de peptona,
500 µl de metanol,
1,34 g de base de nitrógeno para levaduras, sin aminoácidos,
4 µg de biotina,
0,1 M fosfato de potasio, pH 6,0.

BMG (1 litro): 1 ml de glicerol,

1,34 g de base de nitrógeno para levaduras, sin aminoácidos,
4 µg de biotina,
0,1 M fosfato de potasio, pH 6,0.

BMM (1 litro): 500 µl de metanol,

1,34 g de base de nitrógeno para levaduras, sin aminoácidos,
4 µg de biotina,
0,1 M fosfato de potasio, pH 6,0.

MG (1 litro): 1,34 g de base de nitrógeno para levaduras,
4 µg de biotina,
1 ml de glicerol.

MM (ya descrito)

Todos los cultivos se hicieron a 30 °C. En caso de medios líquidos se sometieron a una agitación suficientemente fuerte como para conseguir una adecuada oxigenación.

Fermentación

BSM (1 litro): 26,7 ml de H_3PO_4 85%,
0,93 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
18,2 g de K_2SO_4 ,
14,9 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
4,13 g de KOH,
40,0 g de glicerol
5 ml de PTM_1 con biotina.

PTM_1 (100 ml), solución de elementos traza con biotina:

0,6 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$,
80 mg de KI,
0,3 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$,
20 mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
20 mg de H_3BO_3 ,
50 mg de CoCl_2 ,
2 g de ZnCl_2 ,
6,5 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
20 mg de biotina,
0,5 ml de H_2SO_4 ,

Cultivo de hongos filamentosos

Para su mantenimiento, se ha utilizado caldo de dextrosa y patata comercial (PDB), suplementando con agar a 15 g/l para los cultivos sólidos, denominándose entonces agar de dextrosa y patata (PDA).

En el caso de *Aspergillus giganteus*, también se ha mantenido en un medio sólido conteniendo agar 15 g/l, NaNO_3 2 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l, FeSO_4 0,01 g/l, KCl 0,5 g/l y sacarosa 20 g/l.

Para la producción de ribotoxinas y AFP, se ha utilizado el medio líquido descrito por Olson y Goerner (1965), que contiene peptona 2% (p/v), almidón de maíz 2% (p/v), NaCl 0,5% (p/v) y extracto de carne de vaca 1,5% (p/v).

Cultivo de *Ustilago sphaerogena*

Este organismo se mantuvo en medio de patata y dextrosa (PDA y PDB), en el que también se realizó la extracción de DNA genómico. La producción de RNasa U2 y la extracción de RNA se realizaron en el medio descrito por Arima et al. (1968a), al que se denominó «medio *Ustilago*» (MU), compuesto por los siguientes componentes (en p/v):

- 2% glucosa (se preparó aparte, esterilizándola por filtración)
- 0,2% glicocola
- 0,05% $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$
- 0,05% KH_2PO_4
- 0,01% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 0,01% KCl
- 0,01% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

4.- Soluciones de uso general

CI: solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), saturado con TE.

PBS: NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM y Na_2HPO_4 8,1 mM.

PCI: solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), saturado con TE.

TAE 1x: Tris-acetato 0,045 mM, EDTA 0,001 M pH 8,0.

TBE 1x: Tris-borato 0,045 mM, EDTA 0,001 M pH 8,0.

TE: Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5-8,0.

Tampón de aplicación 6x (electroforesis de DNA): azul de bromofenol 0,25% (p/v), cianol de xileno 0,25% (p/v) y glicerol 30% (v/v).

Tampón de aplicación 1x (electroforesis de proteínas): Tris 50 mM pH 7,6, EDTA 2 mM, SDS 1% (p/v), glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0,02% (p/v).

MÉTODOS

1.- Conservación de cepas

Hongos filamentosos

Las cepas de hongos filamentosos se conservaron de dos formas. En muchos casos, simplemente mediante cultivos en agar, en tubos inclinados, cubiertos con aceite de vaselina y a temperatura ambiente. Para aquellos que esporulaban (casi todos), también se recogieron suspensiones de esporas que se secaron en gel de sílice. De esta forma, al echar algunos de los trozos de gel, con esporas adsorbidas, en una placa de medio con un poco de agua, vuelve a crecer el hongo.

E. coli

Las cepas de *E. coli* se conservaron congeladas a -80°C , en presencia de glicerol aproximadamente al 25% (v/v). Para ello, a 1 ml de un cultivo en medio con la correspondiente selección, crecido durante una noche, se le añadió 0,5 ml de glicerol al 80% (v/v). Para volver a crecerlas, se siembran en una placa de LB con presión de selección.

P. pastoris

Para conservar las diferentes cepas de *Pichia pastoris*, éstas se congelaron a -80°C . Para ello, se recogieron las células de 1 ml de cultivo y se resuspendieron en medio YPD conteniendo un 15% o un 50% de glicerol, en un volumen adecuado para obtener una OD_{600} entre 50 y 100. Conservadas de esta forma, las células se mantienen en perfecto estado. Esto se hizo tanto con la cepa GS115 original, como con los controles de expresión y con las cepas recombinantes. Para volver a crecer las cepas así congeladas, el primer paso fue sembrarlas en una placa de YPD (cepa GS115) o de MD (cepas His^+).

U. sphaerogena

La cepa de *U. sphaerogena* se mantuvo mediante sucesivos sembrados en placa de cultivo con PDA, ya que no se ha podido desarrollar un protocolo de congelación adecuado.

2.- Aislamiento de DNA genómico

De hongos filamentosos

Para aislar el DNA genómico de los distintos hongos filamentosos se crecieron cultivos líquidos de 100 ml de PDB, inoculados con suspensiones de esporas tomadas de cultivos en medio sólido. En el caso de hongos que no esporularan, se inocularon con abundante micelio. Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación durante una noche. Una vez obtenida suficiente cantidad de micelio, éstos se filtraron y secaron con toallas de papel, machacándolos en un mortero con nitrógeno líquido. Una vez pulverizados, se resuspendieron en 6 ml de tampón Tris-HCl 200 mM pH 8,5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5% (p/v), calentando a 65 °C, durante 10 minutos. De esta forma, se produce la rotura de la pared celular y de la membrana, como consecuencia del choque osmótico producido por la sacarosa, y por la acción del SDS. Este proceso se ve acelerado por la temperatura. Las muestras de DNA genómico se desproteinizaron y deslipidizaron mediante sucesivas extracciones con PCI y lavado con CI (a este proceso se le llama «fenolización» en el resto de los métodos descritos a continuación). El DNA genómico se precipitó, a temperatura ambiente, con 1/10 (v/v) de NaAcO 3 M pH 5,2 y 0,6 volúmenes de isopropanol, lavándolo con etanol al 70%, y dejándolo secar al aire en una campana de flujo laminar. El DNA genómico precipitado se disolvió en 600 µl de TE. Para el eliminar el RNA contaminante, se añadió un paso de incubación con 10 µl de RNasa A (25 mg/ml), durante 1 h a 37 °C, tras lo cual se fenolizó y se precipitó igual que en el paso anterior. Los DNA secos se resuspendieron en 600 µl de TE, y se guardaron congelados a -20 °C. La concentración y pureza del DNA, se calcularon a partir de su A_{260} , de la relación A_{260}/A_{280} y mediante la realización de una electroforesis en gel de agarosa.

De *Pichia pastoris*

Con el objeto de determinar la presencia del gen de la pre- α -sarcina en el genoma de las cepas transformadas, se aisló éste según el protocolo de Hoffman y Winston (1987) para *S. cerevisiae*. Para ello se inocularon 10 ml de YPD con células de las cepas cuyos genomas se querían obtener, creciéndose a 30 °C hasta saturación (dos días). Las células se recogieron por centrifugación a 2500 g, durante 2 min y se resuspendieron en 0,5 ml de agua. Se pasaron a un tubo de microfuga, centrifugándose en ésta. Una vez decantada la mayor parte del sobrenadante, se agitaron los tubos para resuspender las células en el líquido residual. A esta suspensión se le añadió 0,2 ml de solución

detergente (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM Na₂EDTA), 0,2 ml de PCI y 0,3 ml de bolitas de cristal, de 0,5 mm de diámetro, lavadas en ácido. Esta mezcla se agitó en vórtex durante 3-4 minutos. Después de la agitación se le añadió 0,2 ml de TE (pH 8) y se centrifugaron 5 min en microfuga. Se separó el sobrenadante de los restos celulares y se precipitó el DNA añadiendo 1 ml de etanol. Se centrifugó durante 2 min y el sedimento se resuspendió en 0,4 ml de TE, al que previamente se había añadido 3 µl de RNasa A (10 mg/ml). Se incubó durante 5 min a 37 °C y se precipitó el DNA añadiendo 40 µl de solución salina (4 M LiCl, 0,1 M MgCl₂) y 1 ml de etanol a -20 °C. Se centrifugó a 4 °C, durante 2 min, y se secó el DNA sedimentado, resuspendiéndolo finalmente en 50 µl de TE. El DNA así purificado se caracterizó espectroscópicamente, calculando la relación A_{260}/A_{280} y la concentración (según la A_{260}).

De *Ustilago sphaerogena*

El DNA genómico de *Ustilago sphaerogena* se aisló siguiendo un protocolo proporcionado por el Dr. J. Kronstad, de la *University of British Columbia*. Una cepa de *U. maydis* sirvió como control.

Se inocularon 50 ml de PDB en erlenmeyers de 250 ml con las cepas de *Ustilago*, y se incubaron a 30 °C durante una noche. El micelio se recogió por centrifugación (10 min a 7000 g), tras lo cual se lavaron con 10 ml de agua, volviendo a centrifugarlos en tubos Corex de vidrio de 25 ml. Al micelio se le añadieron 2 g de cuentas de cristal de 0,5 mm lavadas con ácido, 5 ml de tampón 0,5 M NaCl, 0,2 M Tris, 0,01 M EDTA, 1% SDS, pH 7,5, recién preparado, y 2,5 ml de PCI. La mezcla se agitó en un vortex durante cinco ciclos de 30 s, dejándola en hielo entre un ciclo y otro. Con esto se consigue, en un solo paso, romper la pared celular, disgregar la membrana y desnaturalizar y extraer las proteínas. La fase acuosa se separó por centrifugación a 4 °C, y se fenolizó de nuevo. El DNA se precipitó con acetato de sodio y etanol, resuspendiéndolo en 500 µl de TE. Tras analizarlo en una electroforesis en gel de agarosa, se vio que había abundante RNA, por lo que se incubó con 10 µl de RNasa A (25 mg/ml) durante 1 h a 37 °C, y se repitió la fenolización. Finalmente, se precipitó con acetato de sodio e isopropanol. El DNA así obtenido se cuantificó por espectrofotometría y se analizó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.- Aislamiento de RNA

De *U. sphaerogena*

El RNA total se aisló a partir del micelio de *U. sphaerogena* según el método de desnaturalización por isotiocianato de guanidinio (Chomeczyski y Sacchi, 1987), para evitar la acción de las RNasas, pero purificando finalmente el RNA por ultracentrifugación en gradiente de CsCl (Sambrook et al., 1989). El micelio se aisló en condiciones de máxima producción de RNasa U2, lo que se comprobó mediante las correspondientes medidas de actividad enzimática.

Con un preinóculo de *U. sphaerogena* en medio PDB, se inocularon 2 erlenmeyers conteniendo 50 ml del medio en el que se describió la producción de RNasa U2 (Arima et al., 1968a), al que se denominó «medio *Ustilago*» (MU), y se incubaron durante 45 h a 30 °C. El micelio se recogió por centrifugación (10 min a 5000g), lavándolo con agua tratada con DEPC (30 ml por tubo de centrifuga). El micelio recogido se pesó, y se añadió solución desnaturalizante (isotiocianato de guanidinio 4M, citrato de sodio 25 mM, 0,5% laurilsarcosinato, pH 7,0), en proporción de 2 ml por cada 300 mg de micelio. Se añadió además 5 µl de 2-mercaptoetanol y 1 µl de antiespumante 289 (Sigma) por cada ml de solución desnaturalizante. La mezcla se homogeneizó en un «Politrón» (cuyo vástago se había dejado toda la noche en cloroformo, para evitar la presencia de RNasas y microorganismos, tras lo cual se lavó con agua tratada con DEPC), mediante tres ciclos de 20 s, siempre con cuidado de que se formara poca espuma. Se centrifugó (10 min a 3000 g), y se descartó el sedimento. El sobrenadante se aplicó sobre tubos conteniendo una solución de CsCl 5,7 M, EDTA 0,01 M, tratada con DEPC (Sambrook et al., 1989). La aplicación se llevó a cabo con una jeringa de 10 ml con aguja estéril de 25G, para fragmentar el DNA cromosómico. Se centrifugó en un rotor SW28 (Beckman), durante 24 h a 25 000 rpm y 20 °C, tras lo cual se retiró con pipeta Pasteur el líquido por la parte superior hasta 0,5 cm por encima del menisco del fondo de los tubos. Se cortaron los tubos por encima del nivel de líquido, con un bisturí calentado al rojo, y se vació el resto con una pipeta automática. El sedimento que queda en el fondo de los tubos es el RNA. Se secaron volcándolos y golpeándolos contra toallas de papel, con cuidado de que no se perdiera el RNA. Se lavó rellenando el fondo de los tubos con 1 ml de etanol al 75%, y se vaciaron igual, dejándolos secar por completo, a temperatura ambiente. El RNA se disolvió entonces en 475 µl de agua tratada con DEPC, pasándolo a un tubo de 2 ml. Se precipitó añadiendo 30 µl de NaAcO 3 M, pH 5,2, y 0,9 ml de etanol frío, y se dejó más de 30 min en hielo, en la cámara fría, centrifugándolo después en frío durante 10 min en una

microfuga. Se lavó con etanol al 70%, se secó a temperatura ambiente, y se resuspendió en 100 µl de agua tratada con DEPC. El RNA así obtenido se analizó, realizando un espectro de absorción y una electroforesis en gel de agarosa..

Para conservarlo, se le añadieron 3 volúmenes de etanol y se guardó a -80 °C. Cuando se quiso utilizar, se sacó y se le añadió 1/10 del volumen de NaAcO 3 M pH 5,2, dejándolo en hielo durante media hora y centrifugando después. Tras secar el sedimento de RNA obtenido, se disolvió en la cantidad necesaria de agua estéril.

4.- Reacciones de amplificación por PCR

Se describen a continuación las PCR utilizadas para las aplicaciones más específicas.

Detección de ribotoxinas

Con la idea de detectar específicamente la presencia de genes de ribotoxinas en el genoma de los hongos filamentosos, se diseñaron en el laboratorio del Dr. Julian Davies dos oligonucleotidos que se correspondían con las secuencias más conservadas en los genes que se conocían antes de este estudio. Estos oligonucleotidos son KQ1 (5'-CCTCTYTCCGACGGCAAGAC-3') y KQ2 (5'-GTTRGGATARGTRTAGATGACC-3'). Con estos dos oligonucleotidos se debería amplificar, si fueran iguales los genes, un fragmento de 273 pb, correspondiente a los residuos 38 a 128 de la α -sarcina (figura 14).

Utilizando estos oligonucleotidos se llevaron a cabo reacciones de PCR con todos los DNA purificados, mediante la estrategia de *touchdown* (Don et al., 1991; Roux y Hecker, 1997), que consiste en ir bajando sucesivamente la temperatura de hibridación, por lo que se amplifican preferentemente aquellas secuencias que hibridan mejor (a más alta temperatura) con los oligonucleotidos, pero que a la vez permite que se amplifiquen secuencias que hibriden en un amplio intervalo de temperaturas; de esta forma, las bandas más específicas se amplifican mucho más que las menos específicas. En concreto, se realizaron en un miniciclador, tras una desnaturalización de 5 min a 94 °C, 30 ciclos de desnaturalización (90 s a 94 °C), hibridación (60 s empezando a 65 y terminando a 50 °C, bajando medio grado en cada ciclo) y extensión (120 s a 72 °C), seguido de otros 15 ciclos con la hibridación a 50

°C. Se usó la polimerasa *Taq*. El resultado de estas reacciones se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%.

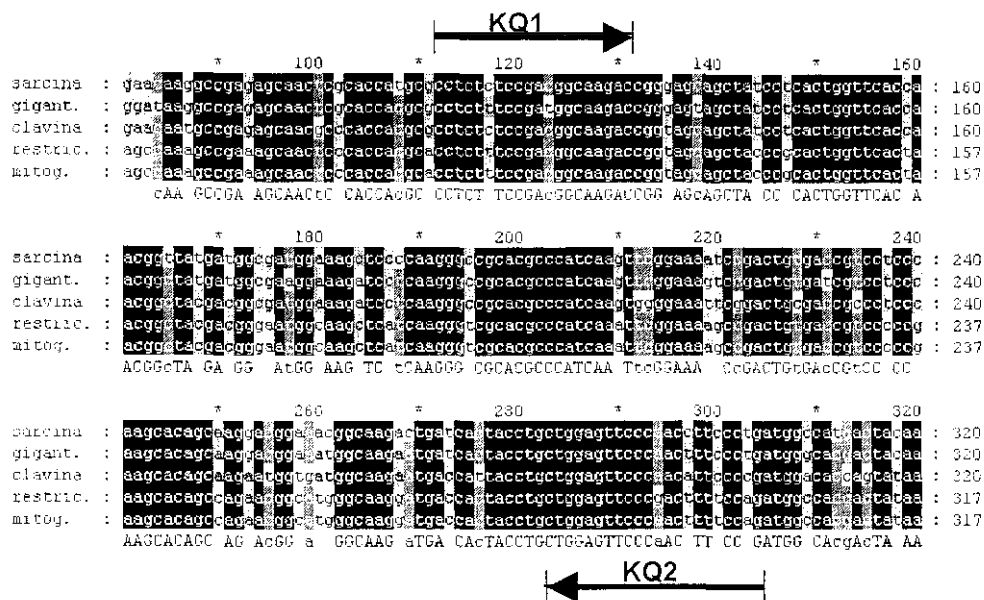


Figura 14: Alineamiento de las secuencias de DNA de las ribotoxinas conocidas anteriormente, marcando las secuencias de los oligos KQ1 y KQ2.

Obtención del gen y cDNA de la RNasa U2

Para detectar y amplificar el gen de la RNasa U2, se diseñaron dos oligonucleotidos que se correspondieran con regiones de los extremos de la secuencia de la proteína madura, pero que no fueran muy degenerados. Para ello, se utilizó una tabla de utilización de codones en los genes de *U. maydis* secuenciados, proporcionada por el Dr. J. Kronstad, eligiendo los codones más frecuentes. Así, los oligonucleotidos fueron los siguientes:

U2-5: 5'-ACC AAC TGC GGC GGC AAC GT'S TA-3'

U2-3: 5'- GCA CTG GGT GAA GCC GTC RTA-3',

que corresponden a los aminoácidos 7 a 14 (TNCGGNVY) y 107 a 113 (YDGFYQC), y que permitían amplificar el fragmento que codificara para los aminoácidos 7 a 113, por lo que se suponía una longitud de 318 pb, si no hubiera ningún intrón.

En la PCR se utilizaron distintas cantidades del DNA obtenido, en concreto 20 y 2 μ l de diluciones 1/20 y 1/2000, para un volumen final de reacción de 50 μ l. La concentración de $MgCl_2$ fue 1,5 mM, y se usaron 50 pmol

de oligonucleotidos, y 1 µl de DNA polimerasa *Taq*, que se añadió justo antes de colocar los tubos en el termociclador precalentado a 94 °C. El programa usado consistía en una desnaturalización inicial de 15 min a 94 °C, 30 ciclos de desnaturalización (90 s, 94 °C), hibridación (60 s, 60 °C) y extensión (120 s, 72 °C), seguidos de una extensión final de 8 min a 72 °C. La temperatura de hibridación era más baja de la que correspondía a los oligonucleotidos, con la idea de compensar los posibles desapareamientos que pudiera haber en la secuencia del gen con respecto a la de los oligonucleotidos. La purificación de los fragmentos de DNA obtenidos, así como su secuenciación, se llevó a cabo como se indica para la detección de ribotoxinas.

Para la síntesis del cDNA, se utilizó el *Marathon cDNA amplification kit* de Clontech, partiendo de 5 µg de RNA total. Siguiendo las instrucciones del *kit*, se sintetizó cDNA de doble hebra. Para la síntesis de la primera hebra, se utilizó la transcriptasa inversa del virus AMV, y un oligonucleotido con una región oligo(dT) con dos nucleótidos degenerados en 3', lo que hace que este oligonucleotido hibride con la zona de inicio de la cola de poli(A). La síntesis de la segunda hebra se realiza con una mezcla de la polimerasa I de DNA de *E. coli*, RNasa H y ligasa de DNA de *E. coli*; además, se utiliza la polimerasa de DNA de T4 para romar los extremos del cDNA de doble hebra sintetizado.

Para comprobar la presencia del gen de la RNasa U2 en el cDNA sintetizado, se llevó a cabo una amplificación por PCR utilizando los mismos oligonucleotidos, U2-5 y U2-3, empleados anteriormente. Los tiempos de los ciclos fueron levemente distintos, para adaptarse a otro termociclador distinto (Perkin-Elmer 2400), pero el resto de las condiciones eran similares. Como control positivo de la amplificación, se utilizó el DNA genómico.

La amplificación del cDNA para clonarlo en los diferentes vectores de expresión se llevó a cabo con distintos oligonucleotidos, que hibridaban con los extremos de la secuencia codificante, y que incorporaban los sitios adecuados para insertarlos en los vectores apropiados para cada estrategia de producción. Estos oligonucleotidos fueron:

U2-5-*Sall*: 5'-dGTCGACAAAAGATGCGACATCCCTCAGTCCACC
AACTGCGGCGGCAA-3'

U2-5-*Mfe*I: 5'-dCAATTGTGCGACAATCCCTCAGTCCA-3'

U2-3-*Not*I: 5'-dGCGGCCGCTTACGAGCACTGGGTGAAGCCGTC
RTA-3'

U2-3-*Bgl*II: 5'-dAGATCTTTACGAGCACTGGGTGAAGC-3'

Tras la amplificación, realizada en condiciones estándar con polimerasa *Taq*, los fragmentos se insertaron en el vector pCR2.1 aprovechando los residuos de adenina protuberantes en 3', mediante el «*TA cloning kit*» de Invitrogen. Estos plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción adecuadas, y se purificaron los fragmentos con la secuencia codificante, para ligarlos con los vectores.

5.- Electroforesis de ácidos nucleicos

Electroforesis de DNA

Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon al 0,7-2% (p/v) en TAE 1x, dependiendo del tamaño del DNA que se quería detectar o purificar. Las electroforesis se desarrollaron a 80-100 V con voltaje constante. En todos los casos se utilizaron patrones de masa molecular, correspondientes a la digestión con *HindIII* del DNA del fago λ , escaleras de 100 pb o de 1 kb (Gibco), u otros plásmidos sin digerir de tamaño y concentración conocidos. Las muestras se aplicaron en tampón de aplicación 6x. Una vez finalizado el proceso electroforético se detectó el DNA por tinción con bromuro de etidio, observándose las bandas bajo luz ultravioleta. También se utilizaron geles de agarosa con bajo punto de fusión (*low melt*) para la purificación de fragmentos pequeños de DNA (100-800 pb) o de productos de la amplificación por PCR. El desarrollo de estas electroforesis se realizó a 4°C, y a 80 V constantes.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Estos geles se realizaron, en la mayoría de los casos, al 4% en acrilamida (p/v) y siempre en condiciones no desnaturalizantes. El tampón utilizado fue TBE. Las electroforesis se desarrollaron a 100 V durante el tiempo deseado y los geles se tiñeron en azul de metileno al 0,01% (p/v). Las electroforesis en geles de poliacrilamida se utilizaron principalmente en la separación con fines preparativos de fragmentos de DNA.

6.- Manipulación de DNA

Aislamiento de plásmidos de *E. coli*

El DNA plasmídico se aisló con el método comercial de Promega «*Wizard minipreps*». Para ello, se inocularon 2-5 ml de medio LB (con el

antibiótico correspondiente) con una colonia aislada del clon de bacterias transformadas que interesaba. El cultivo se creció durante 16 h a 37°C. A continuación las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 10 mM y RNasa A 100 µg/ml. Posteriormente, se lisaron en NaOH 0,2 M, SDS 1%. El pH de la muestra se neutralizó con acetato potásico 1,32 M, y los restos celulares se eliminaron por centrifugación. El sobrenadante conteniendo el DNA plasmídico se puso en contacto con la resina del *kit*, que presenta afinidad por el DNA. Este DNA unido a la resina se lavó con la «solución de lavado» (NaCl 200 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,5, EDTA 5 mM) diluida 1:1 en etanol 95%, eluyéndose a continuación por adición de agua o TE. El DNA plasmídico así purificado se analizó por electroforesis, obteniéndose con un grado de pureza suficiente para análisis de restricción y secuenciación. Cada vez que se preparó un nuevo plásmido, una vez que éste estuvo suficientemente caracterizado, se procedió a su purificación a mayor escala. Para ello, se utilizó el *kit* de «Wizard maxipreps» que, esencialmente, consiste en un tratamiento idéntico al descrito en las líneas anteriores, pero adaptado a 500 ml de cultivo inicial de bacterias.

Aislamiento de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA se purificaron a partir de geles de agarosa o de geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes.

Purificación de fragmentos de DNA de gran tamaño

Se consideran fragmentos de «gran tamaño» a aquellos comprendidos entre 1.5 y 10 Kb. Estos fragmentos se purificaron utilizando el «*Gene clean kit*» de Bio 101. Para ello, se fraccionaron en geles de agarosa, generalmente al 0,7% (p/v), en tampón TAE 1x y se identificaron mediante tinción con bromuro de etidio. Para purificar el fragmento se recortó el bloque de agarosa que lo contenía y se procedió según las indicaciones del *kit*, basado en la unión del DNA a una resina que presenta afinidad por él («*glassmilk*»). Para ello, se añadió una solución de NaI 3 M (tres volúmenes o por peso de gel) al bloque de agarosa y se calentó a 50 °C, hasta la fusión completa de la agarosa. Posteriormente, se añadió el volumen adecuado de «*glassmilk*» (5 µl por 5 µg o menos de DNA, y 1 µl por cada 0,5 µg de DNA de más). La unión del DNA a la matriz se realizó en hielo durante 5 minutos. Tras centrifugación breve se resuspendió el sedimento (DNA-*glassmilk*) en la solución de lavado («*new wash*») y se lavó sucesivamente. Finalmente, se añadió un volumen de TE o H₂O igual al añadido de «*glassmilk*», y se calentó a 50 °C durante 3 minutos, para favorecer la disociación del complejo. Mediante centrifugación se separó el DNA purificado contenido en el sobrenadante. El proceso de elución del

DNA se repitió dos veces más. El grado de purificación y rendimiento del DNA se determinó por electroforesis en geles de agarosa.

Para la purificación a partir de geles de poliacrilamida al 4% (p/v) en TBE 1x, se recortaron las bandas del gel conteniendo el DNA y, una vez troceadas, se metieron en un *tip* de 1 ml sellado por la punta, y que contenía en su interior una cantidad adecuada de lana de vidrio. Se añadió un volumen adecuado de agua y se dejó agitando a 37 °C, 16 h. Tras la incubación, se cortó la punta sellada, y se eluyó el DNA por centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos. La lana de vidrio retiene los fragmentos de acrilamida, mientras que el DNA se recoge en un tubo colocado a tal efecto en el extremo del *tip*. El DNA se precipitó por adición de 1/10 (v/v) de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol enfriado a -20 °C. Posteriormente, se lavó el DNA precipitado con etanol al 70% (v/v) frío, y se resuspendió en un volumen conveniente de agua o TE.

Purificación de fragmentos de DNA de pequeño tamaño

Se considera que fragmentos de pequeño tamaño son los comprendidos entre 100 y 1500 pb. Estos fragmentos se purificaron a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión.

Para la purificación de los fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión, se prepararon geles al 1-2% (p/v) en TAE 1x. La purificación se realizó con el método comercial de Promega «*Wizard PCR preps*», similar al utilizado para la purificación de DNA plasmídico. En este caso, se procedió inicialmente a fundir el bloque de agarosa, por incubación durante 5 minutos a 55-65 °C, y se añadió rápidamente la resina suministrada en el *kit*. El proceso de unión del DNA a la resina, su posterior lavado y elución se realizó del mismo modo que el descrito para la purificación de DNA plasmídico.

Purificación de fragmentos de DNA amplificados por PCR

El DNA amplificado se purificó a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión, utilizando el sistema de Promega «*Wizard PCR preps*», por el mismo método descrito para la purificación de fragmentos de DNA de pequeño tamaño, explicado en el apartado anterior.

En el caso de la purificación de los fragmentos de genes de ribotoxinas, obtenidos por PCR, se aplicaron en geles de agarosa al 1,5%, recortándose las bandas y extrayéndolas con el «*Qiaex II gel extraction kit*» de Qiagen, un sistema similar al ya descrito de Promega.

Reacciones de modificación de DNA

Endonucleasas de restricción

La utilización de estas enzimas permitió la obtención de fragmentos de DNA que hicieron posible la formación de construcciones útiles para la clonación y expresión de genes de las distintas proteínas estudiadas. Todas las digestiones enzimáticas del DNA se realizaron en condiciones de temperatura óptimas para cada enzima. En cada caso se utilizó una mezcla de reacción conteniendo el tampón adecuado para cada enzima, RNasa A (0,5 mg/ml) y albúmina de suero bovino (BSA; 1 mg/ml). En los casos en los que fue necesario, la enzima fue posteriormente inactivada por calentamiento a 65 °C, o por extracción mediante fenolización. El rendimiento de las digestiones se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 0,7-1% (p/v) en TAE.

Ligación de fragmentos de DNA

La reacción de ligación de fragmentos de DNA, necesaria para el clonaje de los fragmentos de DNA en los diferentes vectores de expresión y su posterior transformación en cepas de *E. coli*, se realizó utilizando la DNA ligasa del bacteriofago T4. La mezcla de reacción se completó con el tampón de la ligasa y ATP 1 mM, y se mantuvo a 16 °C durante 4-16 horas. En los casos en los que los fragmentos tenían extremos cohesivos compatibles la mezcla se calentó previamente a 65 °C, durante 15 minutos, y se enfrió en hielo, para favorecer la formación de uniones intermoleculares.

También se ha utilizado el «*Rapid DNA ligation kit*» de Boehringer, que permite, con un tampón especial, realizar la ligación durante 5 min a temperatura ambiente, en las condiciones descritas en sus instrucciones.

Reacción con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa

La utilización de esta enzima permitió obtener extremos romos a partir de fragmentos con extremos protuberantes en 5', así como reañadir la elongación in vitro de fragmentos molde de DNA, cuando esto fue necesario. La mezcla de reacción contiene el fragmento de DNA, una mezcla de dNTP (2 mM cada uno), solución NTB (10x: Tris-HCl 0,5 M pH 7,0, MgSO₄ 0,1 M, DTT 1 mM, BSA 0,5 mg/ml) y la enzima Klenow (2,5 unidades), se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. La inactivación posterior de la enzima se realizó por calentamiento a 65 °C, durante 10 min. En algunas ocasiones fue preciso purificar el fragmento de DNA tras la reacción, para lo cual, tras una fenolización y extracción con éter, se precipitó con etanol.

Secuenciación de DNA

Secuenciación automática

La secuenciación de las construcciones génicas insertadas en los vectores plasmídicos se llevó a cabo en el Centro de Secuenciación Automatizada de DNA de la Universidad Complutense de Madrid, o en la empresa TerraGen de Vancouver, mediante secuenciación cíclica con terminadores marcados con sondas fluorescentes

Se utilizó el «ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready reaction kit» (Perkin Elmer) con la DNA polimerasa «Ampli Taq, FS». Esta enzima es un doble mutante de la polimerasa Taq, que carece de actividad exonucleasa 5'-3' y tiene una mutación en el dominio polimerasa, lo que permite una menor discriminación frente a los ddNTP respecto a la enzima original.

Una vez realizada la amplificación a la temperatura de hibridación del oligonucleótido empleado (20 ciclos), se purificaron los productos de reacción por precipitación con etanol o por separación en una minicolumna de Sephadex G-50, y se separaron mediante electroforesis en un gel desnaturalizante, compuesto por urea y acrilamida Long Ranger. La electroforesis se desarrolló a 1680 V, 50 mA, 150 W, durante 9 horas, en un secuenciador ABI PRISM 377. Conforme migran los fragmentos de DNA, pasan por un láser que excita cada uno de los fluoróforos. La emisión producida por estos es recogida en el secuenciador e interpretada adecuadamente por éste para asignar un determinado nucleótido.

Mutagénesis dirigida

La obtención de diferentes formas mutantes de α -sarcina se realizó a partir de mutaciones en el cDNA de la α -sarcina, utilizando diferentes oligonucleótidos mutagénicos. Así, se sintetizaron oligonucleótidos que hibridaban con diferentes zonas del ssDNA molde, y en las cuales se habían sustituido diferentes bases. Se siguió el método descrito por Kunkel et al. (1987) basado en el enriquecimiento en uridina del DNA de cadena simple usado como molde a mutar (ssDNA-U).

Purificación de DNA de cadena simple (ssDNA)

El clonaje de un fragmento de DNA en un plásmido que contenga en su secuencia un origen de replicación para un fago filamentoso permite su

utilización para la obtención de ssDNA. Este ssDNA es el molde de los ensayos de mutagénesis dirigida por oligonucleotido.

Esta técnica se realizó de acuerdo con Messing (1983) y basándose en lo descrito por Merola et al. (1989). Se partió de células de *E. coli* transformadas con el vector pEMBL18(+), que llevaba clonado el inserto adecuado en cada caso. Este vector, contiene en su secuencia un origen de replicación para el fago F1, de manera que tras la transfección con dicho virus las bacterias secretan la hebra no codificante (*antisense*) del pEMBL18(+) en forma de partícula vírica.

Para ello, se inoculó una colonia de *E. coli* transformada, en 2-50 ml de YT con ampicilina y glucosa 0,2%, y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,42. En ese momento se añadieron 20-200 µl de fago ($1,5 \times 10^{12}$ partículas/ml) para transfectar las células de *E. coli*. Se mantuvo la incubación 5 horas, tras lo cual se centrifugó a 10000 g para eliminar el sedimento celular. Al sobrenadante conteniendo los fagos y las partículas víricas se le añadió una cantidad de polietilenglicol (PEG) y NaCl suficiente para alcanzar unas concentraciones finales del 2,5% (p/v) y 2,5 M, respectivamente, y se mantuvo 2 horas a 4 °C. Tras centrifugación, los sedimentos se resuspendieron en un volumen adecuado de TE con RNasa A 0,5% (p/v). La muestra se extrajo con 1 ml de PCI y la fase acuosa se lavó repetidamente con éter etílico. El ssDNA contenido en esta fase acuosa se precipitó con 1/10 (v/v) de LiCl 4M, MgCl₂ 0,1 M, pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol frío. El ssDNA así precipitado se lavó con etanol al 70%, y se disolvió en un volumen adecuado de TE o agua.

Mutagénesis con DNA plasmídico enriquecido en uridina (método de Kunkel)

La preparación del DNA conteniendo uridina requiere su transformación en un cepa de *E. coli*, que reúna ciertas características: susceptibilidad a la infección con fagos filamentosos pequeños; presentar un genotipo *dut*⁻ (*dut1*) y *ung*⁻ (*ung1*), necesario para la incorporación y estabilidad de la uridina al DNA del fago; y, por último, una tasa de mutación espontánea baja. Concretamente, se utilizó la cepa BW313.

Las células transformadas se crecieron en placas de LB con ampicilina y uridina (1 µg/ml). A continuación, se procedió a la obtención del ssDNA molde enriquecido en uracilo (ssDNA-U), para lo cual se siguió el protocolo descrito anteriormente, pero realizando el cultivo en un medio suplementado con uridina 1 µg/ml. La reacción de mutagénesis propiamente dicha, se realizó por hibridación de este ssDNA-U con el oligonucleotido mutagénico

fosforilado. Para ello, se mezclaron en una relación molar 1:10 (ssDNA-U: oligo) y se calentaron 2 min a 70 °C. La mezcla se dejó enfriar lentamente hasta 25 °C. Una vez alcanzada esta temperatura se puso en hielo y se añadieron los componentes para la síntesis y ligación del DNA. La reacción se llevó a cabo en HEPES 200 mM pH 7,8, DTT 2 mM, MgCl₂ 10 mM, mezcla de dNTP 500 µM, ATP 1 mM, 1-3 unidades de DNA polimerasa Klenow y 2-5 unidades de la DNA ligasa del fago T4. El proceso completo supone una incubación durante 5 minutos en hielo, seguida de 5 minutos a temperatura ambiente y 2 horas a 37 °C. De esta forma, se facilita la hibridación y posterior acción de la DNA polimerasa Klenow y de la ligasa. La adición de EDTA a 15 mM finalizó la reacción.

Con la mezcla mutagénica se transformaron células de *E. coli* y se seleccionaron las colonias que contenían el vector con el inserto. La existencia única de la mutación deseada se determinó por secuenciación.

7.- Transformación de células y selección de recombinantes

Transformación de *E. coli*

Preparación de células competentes

Básicamente, se ha seguido el método de Hanahan (1983), con una modificación que implica el empleo de RbCl, según recomendaciones del Dr. J.L. García López, del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Para ello, células de *E. coli*, sembradas recientemente en placa Petri, se inocularon en 5 ml de *ψ Broth*, y se incubaron a 37 °C con agitación fuerte hasta alcanzar una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0,3. Una vez alcanzada ésta, se inocularon 100 ml de *ψ Broth* con el cultivo anterior y se incubaron hasta que la OD₆₀₀ fue 0,48. El crecimiento del cultivo se detuvo en hielo, y las células se sedimentaron por centrifugación a 2500 g. El sedimento se resuspendió en 30 ml de Tfb1 frío (RbCl₂ 100 mM, MnCl₂ 50 mM, KAcO 30 mM, CaCl₂·H₂O 10 mM, glicerol 15% (v/v), pH 5,2 ajustado con HAcO 0,2 M), y se mantuvo en hielo durante 90 minutos. Las células se sedimentaron de nuevo, en las mismas condiciones que la vez anterior, y se resuspendieron en 4 ml de Tfb2 frío (MOPS 10 mM, RbCl₂ 10 mM, CaCl₂·H₂O 75 mM, glicerol 75% (v/v), pH 7,0 ajustado con NaOH). Las células competentes así obtenidas se distribuyeron en alícuotas de 0,2 ml y se congelaron a -80 °C.

Transformación de células de *E. coli*

Células competentes, preparadas como se indica anteriormente, se descongelaron y se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. A continuación, se añadió el DNA plasmídico o la mezcla de ligación que se deseaba transformar (1-100 ng de DNA), y se mantuvieron otros 15 minutos en hielo. La entrada del DNA plasmídico al interior de las células se facilitó mediante un choque térmico por incubación a 37 °C, durante 4 minutos, y enfriamiento posterior en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 4 volúmenes de *ψ Broth* y se incubó la mezcla a 37 °C durante 1 hora, para permitir la recuperación de la integridad de la membrana y la expresión del gen selector de los vectores. Finalmente, se plaquearon diferentes volúmenes en placas de LB con el antibiótico correspondiente, que se incubaron hasta la aparición de colonias transformadas.

Selección de colonias

Se utilizaron diferentes criterios para seleccionar las colonias de *E. coli* que hubiesen incorporado el vector deseado.

Selección por color

Esta selección se basa en la expresión, o no, del gen de la β -galactosidasa incluido en el DNA plasmídico. Para ello, se plaquearon las células transformadas en placas de LB-agar con antibiótico (1 μ g/ml), a las que se había añadido 40 μ l de IPTG 100 mM y 40 μ l de X-Gal 23 mg/ml. El clonaje del inserto en el plásmido produce la alteración del gen de la β -galactosidasa, de manera que éste pierde la capacidad para hidrolizar el X-Gal, obteniéndose colonias incoloras frente a las colonias azules que contienen el plásmido sin inserto.

Selección por tamaño del plásmido («minis de colonias»)

Las colonias obtenidas de una transformación se sembraron de forma ordenada en placas de LB-agar con antibiótico, para obtener más masa celular. Parte de estas colonias se recogieron con un asa de siembra y se lisaron en 40 μ l de tampón de lisis (Tris 1 M pH 7,4-8,0, EDTA 0,5 M, NaOH 10 N y SDS 20%). La mezcla se neutralizó con 3 μ l de HCl 1 N, y se añadieron 5 μ l de tampón de aplicación 6x. La mezcla se congeló a -80°C durante 15 minutos, de manera que el SDS al precipitar arrastre con él al DNA cromosómico. Mediante centrifugación en frío durante 10 minutos se sedimentó el SDS y la mayoría del DNA cromosómico, así como los restos celulares. El sobrenadante conteniendo el DNA plasmídico se analizó por electroforesis en geles de agarosa, distinguiéndose los plásmidos sin inserto de los que lo hubiesen incorporado, por su diferente movilidad electroforética.

Transformación de *P. pastoris*

Transformación por cloruro de litio

Éste es uno de los dos métodos usados de transformación basados en el uso de litio, como describieron Ito et al. (1983) para *S. cerevisiae*.

Se inocularon 50 ml de YPD con una colonia fresca de *P. pastoris*. El cultivo se creció hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 1,0 (5×10^7 células/ml aproximadamente). Se recogieron las células por centrifugación a 1500 g durante 10 min a temperatura ambiente. Se lavaron con 10 ml de agua estéril y se volvieron a centrifugar en idénticas condiciones. Se lavaron de nuevo con 10 ml de TE estéril a pH 7,4 y, finalmente, se resuspendieron en 2 ml de la solución TE/LiCl (0,1 M LiCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA), en la que se incubaron a 30 °C durante una hora. Para cada transformación se preparó, en tubos de reacción de 1,5 ml y estériles, lo siguiente: 0,1 ml de células, 1 µl de DNA de esperma de salmón (10 µg/µl) y 10 µl conteniendo unos 10 µg del fragmento lineal de DNA con el que queríamos transformar (excepto en un control negativo sin este DNA). Estos tubos se incubaron durante media hora a 30 °C, agitando suavemente. Pasado este tiempo, se añadieron 0,7 ml de una solución esterilizada conteniendo 40% de PEG-3350 en TE/LiCl, invirtiendo el tubo para mezclar bien. Se incubó otra media hora a 30 °C y se le dio un choque térmico a 37 °C durante 5 min. Los tubos se centrifugaron brevemente y se resuspendieron las células en 100 µl de agua estéril, que se extendieron en placas de MD. Estas placas se incubaron de 3 a 5 días a 30 °C hasta observar la aparición de colonias.

Transformación por acetato de litio

Éste es otro método de transformación basado en el uso del catión litio, ligeramente diferente del anterior, pero más usado frecuentemente en la transformación de *S. cerevisiae*. En este caso, se siguió el protocolo descrito por Gietz y Schiestl (1995), que además han creado una página *web* donde ofrecen variantes del método (www.umanitoba.ca/faculties/medicine/units/human_genetics/gietz/method.html), incluida una en la que se pueden guardar congeladas las células competentes. Sin embargo, este método no suele ser usado en la transformación de *P. pastoris* porque algunas personas mantienen que el acetato es tóxico para esta levadura. Según la experiencia en nuestro laboratorio, el método es útil, y por eso se usa. Alguna vez se ha comparado la eficacia de transformación realizando la misma transformación por este método con acetato y cloruro, y ha resultado ser levemente superior en el caso del cloruro, pero la diferencia no era muy significativa.

Se inocularon 5 ml de YPD con células frescas de *P. pastoris* GS115, y se incubaron a 30 °C durante toda la noche. Se añadió la cantidad suficiente de este preinóculo para que un cultivo de 50 ml de YPD tuviera una densidad de 5×10^6 células/ml (lo que equivale, en *P. pastoris*, a una OD₆₀₀ de 0,1). El cultivo se incubó a 30 °C hasta que se completaron, al menos, dos divisiones de las células, es decir, hasta que se cuadruplicó la densidad celular. Se recogieron entonces las células por centrifugación en botellas estériles de 50 ml (3000 g, 5 min), lavándose las células con 25 ml de agua y centrifugándose igual. Las células lavadas se resuspendieron en 1 ml de LiAcO 100 mM, y se pasó la suspensión a un tubo de 1,5 ml, en el que se centrifugaron por 30 s. Se resuspendieron de nuevo en 400 µl de LiAcO 100 mM, lo que da un volumen total de unos 500 µl, con una densidad de 2×10^9 células/ml (si se partía de más células, se adaptaba el volumen para mantener la densidad celular). La suspensión de células se agitó y se echaron 50 µl por cada transformación a realizar, en tubos de 1,5 ml. Se centrifugaron los tubos, eliminando el sobrenadante. Sobre las células se echaron 240 µl de PEG 3350 al 50%. Esta disolución de PEG actúa como barrera, y sobre ella se añadieron 36 µl de LiAcO 1,0 M, 25 µl de ssDNA de salmón (una disolución a 2 mg/ml, que previamente se hirvió durante 5 min, enfriándolo rápidamente en hielo) y 50 µl de agua, conteniendo el DNA con el que queremos transformar (0,1 a 10 µg, generalmente se usaron 5 o 10 µg). Se agitaron vigorosamente los tubos para mezclarlo todo (puede tardar 1 min), y se incubaron a 30 °C durante 30 min. Después se les dio un choque térmico a 42 °C durante 20 min, en baño de agua, y se centrifugaron a 6000 rpm durante 30 s, teniendo cuidado de quitar todo el sobrenadante. Se resuspendieron en 200 µl de agua y se extendieron en placas de medio MD, que se incubaron a 30 °C hasta observar colonias.

Transformación por electroporación

Este método consiste en la descarga sobre las células a transformar de un pulso de corriente eléctrica con una gran intensidad de campo, de forma que se induzca una permeabilidad en la membrana que permita tomar el DNA desnudo del exterior celular. Dado que no se disponía del electroporador en nuestro laboratorio, se recurrió a los del Dr. Vivanco (de nuestro mismo Departamento, aunque el aparato se encuentra en su laboratorio de la Fundación Jiménez Díaz) o del centro de investigación de Pharmacia. Sin embargo, este método se utilizó en pocas ocasiones, porque no se obtuvieron mejores resultados que en el caso de los protocolos basados en la utilización de litio.

Se usó para la transformación un electroporador Bio-Rad, equipado con un «controlador del pulso». Este aparato proporciona un pulso que comienza al potencial máximo seleccionado, realizando la descarga con una caída

exponencial. Las electroporaciones se llevaron a cabo en cubetas de 0,2 cm de separación entre las placas de descarga, valor usual en la transformación de células de levaduras. El protocolo usado y detallado a continuación es el descrito por Becker y Guarente (1991).

El día anterior a la electroporación se inocularon 25 ml de YPD con células frescas de *Pichia pastoris* GS115, que se crecieron a 30 °C. Se añadió cantidad suficiente de este cultivo en 100 ml de YPD como para que diera una OD₆₀₀ de aproximadamente 0,5, incubándose entonces hasta que alcanzó una OD₆₀₀ entre 1,3 y 1,5. Las células se centrifugaron a 4 °C y 1500 g, durante 5 min, y se lavaron sucesivamente, centrifugando cada vez, con 100 y 50 ml de agua estéril y 4 ml de sorbitol 1 M, todo enfriado en hielo. Se recogieron por una nueva centrifugación y se resuspendieron en 200 µl de sorbitol 1 M, quedando un volumen total de algo más de 300 µl.

Para cada transformación se pipeteó, en tubos de reacción estériles pre-enfriados, 40 µl de células y 1 µl del DNA lineal a transformar, disuelto en agua a 1 µg/µl. Una de las reacciones se hizo con células, pero sin DNA, usándolo como control negativo. Es importante señalar que en este tipo de transformación no se agrega un DNA inespecífico, pues no hace sino reducir la eficiencia de transformación. La mezcla de transformación se incubó en hielo durante 5 min y después se transfirió a la cubeta de electroporación, que se había enfriado previamente. Se sometió entonces la mezcla al pulso eléctrico definido por los siguientes parámetros: 1,5 kV (fuerza del campo, E₀: 7,5 kV/cm²), 25 µF, 200 Ω. La resistencia especificada es la seleccionada en el controlador del pulso, aunque la muestra aporta una cierta resistencia intrínseca. Con estos valores se consiguieron constantes de tiempo (τ) en torno a los 8 ms. Inmediatamente después del pulso se añadió a las células 1 ml de sorbitol 1 M para permitir su recuperación. Se centrifugaron brevemente para recoger las células en unos 100 µl de la misma mezcla, que se sembraron en placas de MD conteniendo sorbitol 1 M. La presencia del sorbitol es importante para aumentar la eficiencia de transformación, pues permite una mayor recuperación de las células, de hasta un orden de magnitud (Becker y Guarente, 1991). Estas placas se incubaron a 30 °C hasta observar la aparición de colonias (entre tres y cinco días).

Transformación por PEG, congelando células competentes

Este método de transformación es el que se usó más recientemente, sobre todo por la comodidad que supone preparar células competentes para múltiples transformaciones, que se guardan congeladas. El protocolo lo proporciona Invitrogen, y afirman que es más eficiente que el de cloruro de litio.

Se inoculó un precultivo de 10 ml de YPD con células frescas, y se incubó durante toda la noche a 30 °C. Con él se inició un cultivo de 10 ml de YPD a una OD₆₀₀ de 0,1, que se incubó hasta alcanzar una OD₆₀₀ entre 0,5 y 0,8 (tardaba 4 a 6 h). Se recogieron las células por centrifugación (500 g, 5 min, temperatura ambiente), y se lavaron con 10 ml de solución A (sorbitol 1,0 M, bicina 10 mM, pH 8,35, etilenglicol 3 % v/v), centrifugándolos de nuevo. Las células se resuspendieron en 1 ml de solución A, añadiendo 55 µl de DMSO, y se distribuyeron en alícuotas de 50 µl en tubos estériles de 1,5 ml. Se añadieron 11 µl de DMSO a cada tubo, se mezclaron y se enfriaron en un congelador de -80 °C rodeados de isopropanol, para que se congelaran lentamente (el isopropanol se retiró después para conservarlos en cajas de almacenamiento).

Para transformar las células competentes, se descongelaron los tubos necesarios, a los que se añadió el DNA en un volumen no mayor de 5 µl, usando unos 5 µg por transformación. Se añadió 1 ml de solución B (PEG 1000 40%, bicina 0,2 M, pH 8,35), mezclando bien. Se incubó 1 h a 30 °C en baño de agua, mezclando cada 15 min), y se sometió a un choque térmico a 42 °C durante 10 min. Cada transformación se repartió en dos tubos de 1,5 ml, pasando 525 µl de la mezcla a un tubo nuevo. Se añadió 1 ml de YPD a cada tubo y se incubaron a 30 °C durante 1 h. Se recogieron las células por centrifugación (3000 g, 5 min), se resuspendieron con 500 µl de solución C (NaCl 0,15 M, bicina 10 mM, pH 8,35) en cada tubo y se juntaron en un solo tubo de nuevo. Se centrifugaron de nuevo, se resuspendieron en 200 µl de solución C y se extendieron en una placa de medio MD, que se incubó a 30°C hasta que aparecieron colonias.

Selección de recombinantes en el locus de *AOX1* de *P. pastoris*

Las colonias que incorporan, tras la transformación, el fragmento de DNA conteniendo el gen *HIS4* y el de la proteína clonada son capaces de producir His y crecer en un medio mínimo carente de His, como es el medio MD. Presentan, por tanto, fenotipo His⁺. Pero la recombinación puede haberse dado en varios sitios del genoma (figura 10). Entre ellos, lo más habitual sería los loci *HIS4* y *AOX1*. En el primer caso la recombinación probablemente haya hecho perder el gen de la proteína que se pretende producir. Aún así, la prueba definitiva de la correcta transformación de la levadura no es sino la producción de la misma. Para seleccionar las cepas en las que poner en marcha una expresión piloto de la proteína, se buscaron aquellas cepas transformadas que tuvieran alterado su metabolismo de metanol (en el que el primer paso es la oxidación del metanol por la alcohol oxidasa codificada por el gen *AOX1*),

mostrando un fenotipo Mut⁻ («Mut» viene del inglés «*methanol utilization*»), incapaces de crecer en medio mínimo con metanol como única fuente de carbono, o bien un fenotipo Mut^s («*slow*»), que crecen más lentamente que una cepa con el metabolismo metilotrófico normal (fenotipo Mut⁻). En las cepas Mut^s se habrá dado la sustitución, por una doble recombinación, de la secuencia codificante de *AOX1*, quedando así la secuencia que codifica la proteína que se pretende producir sometida al control del promotor de *AOX1*, que permanecerá igual, ya que tanto el genoma como el DNA transformado presentan una copia idéntica.

Para ello, se «picaron» con un palillo estéril las colonias que habían crecido en MD después de la transformación y se preparó una placa de MM y su correspondiente réplica en MD (ambos medios sólo difieren en la fuente de carbono utilizada, metanol o glucosa, respectivamente). Se hizo lo mismo con unas cepas control suministradas por la casa comercial, con fenotipos His⁻/Mut⁻ e His⁺/Mut⁻. Las placas se incubaron a 30 °C entre 2 y 4 días hasta que la distinción de fenotipos fuera clara. En algunos casos, se aisló el DNA cromosómico y se comprobó la existencia o no del gen de la α -sarcina mediante PCR. En el caso de la RNasa U2, además, se desarrolló un método para seleccionar en cultivos en placa las colonias que produjeran más proteína extracelular.

Selección de cepas productoras de ribonucleasa extracelular (actividad frente a RNA, en placa de cultivo)

Este ensayo se desarrolló con la idea de poder seleccionar aquellos transformantes que produjeran mayor cantidad de RNasa extracelular, lo que es especialmente útil para la transformación de *P. pastoris* puesto que, al integrarse el gen codificante de la RNasa en el genoma, esta integración se puede dar en múltiples sitios. De esta forma, se podía hacer una selección rápida, de entre un gran número de transformantes, de aquellos que fueran efectivos productores de RNasa U2.

Se habían descrito sistemas similares para la producción de otras RNasas en otros microorganismos. Así, el grupo de Ulrich Hahn en Berlín, tras producir por primera vez la RNasa T1 en *E. coli* (Quaas et al., 1988), describieron cómo, haciendo crecer una colonia de las que secretaban la enzima en una placa de agar con LB conteniendo 2 g/l de RNA y 50 mg/l de azul de toluidina, se formaba un halo azul en torno a la colonia, que sustituía el color azul del resto de la placa o de colonias que no la producían: esto ocurría

asimismo con la enzima pura, con una relación lineal entre el diámetro del halo y el logaritmo de la concentración de RNasa T1 (Quaas et al., 1989).

Por su parte, el grupo de Ronald Raines, en Wisconsin, desarrolló un ensayo similar para detectar la secreción de RNasa A, tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae*. Preparaban placas de agar con el medio correspondiente y con 2 g/l de RNA, y las colonias se incubaban el tiempo habitual, revelándolas mediante lavados con ácido perclórico al 10%, lo que provocaba la precipitación del RNA no degradado, formando halos claros en el agar turbio (delCardayré et al., 1995). Este sistema de revelado tiene el inconveniente de tener que hacer una réplica para recuperar las colonias estudiadas.

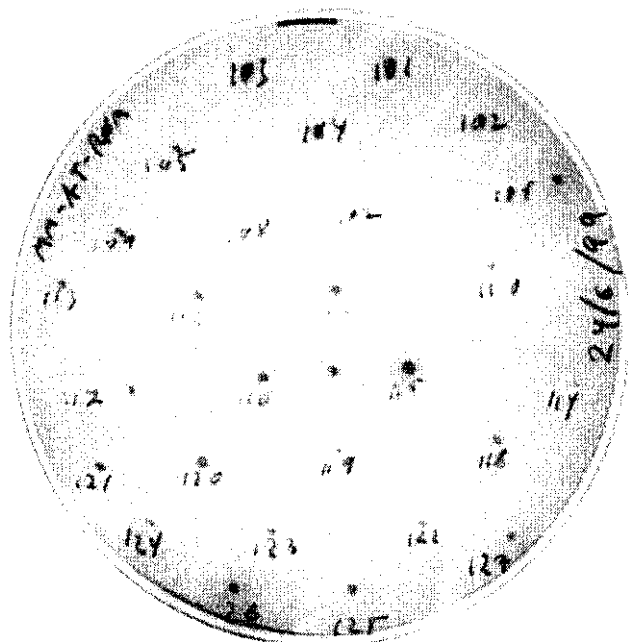


Figura 15: Ensayo de producción de RNasa U2 en *P. pastoris* en placa de cultivo. Las colonias 115 (repetida), 116 y 126 presentan halos oscuros y secretan RNasa U2.

En nuestro caso, el método se modificó convenientemente para adaptarlo a las condiciones de cultivo y producción de la RNasa U2 en esta levadura. Se prepararon placas de agar de MM, el medio mínimo con el metanol como agente inductor, a las que se añadió RNA de *Torula* a 2 g/l y azul de toluidina a 50 mg/l. Las cepas obtenidas de la transformación, a la hora de hacer la selección por fenotipo de utilización por metanol, picándolas en placas MD y MM, se picaron además en estas placas, añadiendo los necesarios controles. Tras una incubación a 30 °C algo más prolongada (3 a 4 días) se observaron halos rojos en torno a algunas colonias, que sustituían al color azul

de la placa, que se podían fotografiar como halos oscuros en blanco y negro mediante un filtro azul (figura 15), aunque en este caso hay que tener cuidado con un «efecto concéntrico» en las placas puesto que el color azul es más intenso en la parte exterior de la placa que en la interior, lo que dificulta la comparación cuantitativa, obligando a variar las condiciones de exposición según la situación de las colonias. Los transformantes que presentaban halos rojos son los que después se ensayaron en producciones piloto en matraz para determinar qué cepa era mejor productora, pero este paso aceleró en gran medida esta selección.

Expresión piloto de proteínas en *P. pastoris* por secreción extracelular

El último paso para seleccionar las cepas obtenidas que produzcan mayores cantidades de la proteína descada es realizar un ensayo de producción piloto a pequeña escala. Para cada cepa a probar (incluyendo la cepa de control que expresa albúmina), se prepararon 40 ml de medio BMGY en erlenmeyers de 250 ml con tapón de gomaespuma, que se inocularon con la colonia fresca correspondiente. Estos cultivos se incubaron a 30 °C con agitación orbital a 300 rpm durante 2 días. De esta forma se alcanza la saturación, con una OD₆₀₀ entre 10 y 20.

Del cultivo total, se recogió 1 ml para congelar a -80 °C y el resto se centrifugó a 4000 g durante 10 min en tubos estériles. Las células se resuspendieron entonces en 8 ml de BMMY y se incubaron en erlenmeyers de 100 ml (con muescas que favorecen la aireación) con dos capas de Miracloth, lo que permitía una mayor aireación. En este medio, en el que la fuente de carbono es el metanol, se debe inducir el promotor de *AOX1* acoplado al gen de la proteína recombinante.

Durante el cultivo en metanol, se fueron recogiendo alícuotas de 1 ml, que se centrifugaron durante 5 min en una microfuga a 4 °C, separando el medio extracelular, que debería contener la proteína heteróloga secretada, de las células, guardando ambas fracciones a -20 °C para su posterior análisis. Además, dado que el metanol se va gastando en el cultivo, bien por el crecimiento de las células (aunque tengan delecionado el gen *AOX1*, presentan fenotipo de crecimiento lento, Mut^s, debido al gen *AOX2*), o bien por evaporación, se fue reponiendo añadiendo la cantidad equivalente al 0,5 % (v/v) del cultivo. Se comprobó, tras distintas tentativas, que se mejora el rendimiento cuando esta reposición se lleva a cabo cada 12 h de cultivo (figura 16).

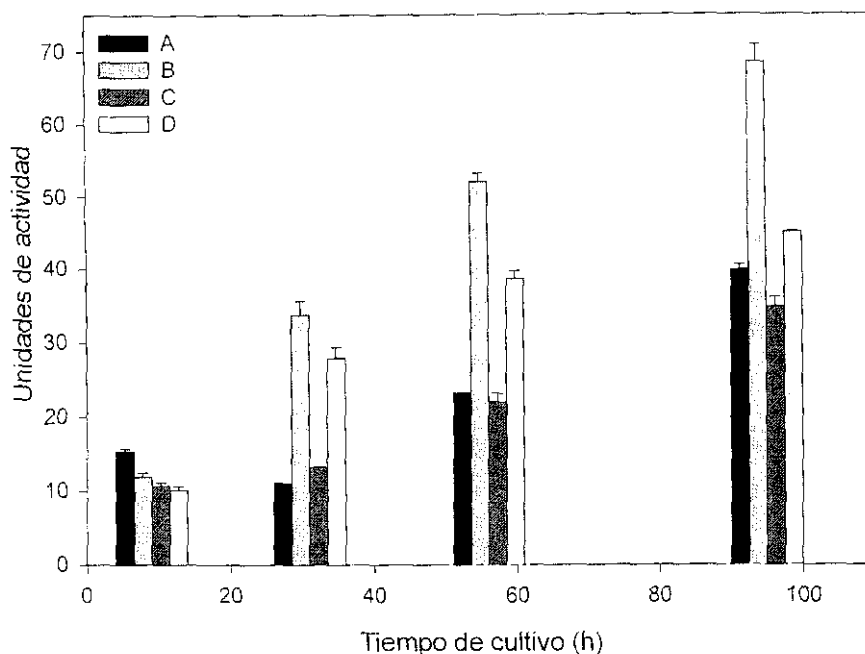


Figura 16: Influencia de la reposición de metanol en la producción de RNasa U2. Se hicieron cultivos en paralelo de la misma cepa de *P. pastoris*, en medio BMM (A, B) o MM (C, D), añadiendo metanol una (A, C) o dos (B, D) veces al día.

Cuando se analizó la presencia de la proteína recombinante en las células, estas se lavaron en 1 ml de tampón para lisis de levaduras (50 mM fosfato de sodio, pH 7,4, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5% glicerol), enfriado en hielo. Se centrifugaron y se resuspendieron en 2 ml de tampón para lisis de levaduras. A 500 μ l de esta suspensión se le añadió un volumen igual de bolitas de cristal de 0,5 mM de diámetro, lavadas en ácido. Se sometió entonces la mezcla a 8 ciclos de agitación en vortex durante 30 s y reposo durante otros 30 s, todo ello a 4 °C. Se centrifugaron durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante así obtenido representa la fracción soluble del lisado celular.

Para detectar la presencia de las proteínas recombinantes en los medios extracelulares o en los lisados celulares, se analizaron por PAGE-SDS, zimograma, inmunotransferencia (sólo la α -sarcina) o por medida de la actividad ribonucleolítica frente a RNA de levadura (sólo la RNasa U2).

Expresión piloto de α -sarcina intracelular en *P. pastoris*

En el caso de la construcción pHILD2-pre α S, no se sabía si la secuencia señal propia de la α -sarcina iba a ser reconocida. Por tanto, se podía producir

la prepro- α -sarcina intracelular. En este tipo de ensayo, a diferencia del de secreción, las levaduras se inducen cuando los cultivos se encuentran en fase de crecimiento exponencial, y se hace a una densidad de células bastante menor, pues no importa el volumen de medio extracelular, ya que no afecta a su concentración.

Para cada cepa ensayada se preparó, de forma estéril, un erlenmeyer de 250 ml. con tapón de gomaespuma, conteniendo 50 ml de medio MGY. Se inoculó cada uno con la cepa correspondiente, incubándose a 30 °C hasta que el cultivo alcanzó una OD₆₀₀ entre 1 y 2. En ese momento, se separó 1 ml para congelar a -80 °C y el resto se centrifugó a 4.000g durante 10 min, resuspendiendo las células en 10 ml del medio de inducción, MM. El cultivo se incubó en erlenmeyers de 100 ml, tapados con doble capa de tela Miracloth a 30 °C, manteniendo una agitación orbital de 300 rpm. Con el fin de mantener la concentración de metanol, en este caso, se añadieron al cultivo 0,5 ml de metanol al 5% a los 2, 4, 5 y 6 días de haber inducido el cultivo.

Se recogieron alícuotas de 1 ml, que se centrifugaron a 4 °C. Se separó el sobrenadante del sedimento celular, que se lavó con 1 ml de tampón para lisis de levaduras, enfriado en hielo. Se centrifugó de nuevo, resuspendiendo las células en el volumen necesario de tampón para obtener una OD₆₀₀ teórica de 50, según la OD₆₀₀ que tuviera inicialmente la alícuota. Se añadió entonces un volumen equivalente de bolitas de cristal de 0,5 mM de diámetro, lavadas en ácido. Se agitaron, a 4 °C, en 8 ciclos de 30 s. con otros 30 s de reposo entre los ciclos. Finalmente, se centrifugaron a 4 °C durante 10 min, recogiendo el sobrenadante, consistente en la fracción soluble del lisado celular. Es en esta fracción donde se analizó el contenido de α -sarcina por electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de SDS e, incluso, tras posterior transferencia a membrana e inmunodetección.

8.- Producción y purificación de proteínas

Ensayo de producción de ribotoxinas en cepas de *Aspergilli*

Para determinar si las cepas de hongos producían ribotoxinas, se crecieron en condiciones similares a las ya descritas para la α -sarcina (Olson y Goerner, 1965), utilizando el mismo medio (peptona al 2%, almidón de maíz al 2%, NaCl al 2% y extracto de carne al 1,5%). Se crecieron dos preinóculos sucesivos de 10 ml durante 24 h, el segundo de los cuales se utilizó para inocular cultivos duplicados de 50 ml, que se incubaron a 30 °C durante 70 h.

Se tomaron alícuotas a distintos tiempos, y se realizaron inmunodetecciones según se explica en el apartado correspondiente.

Producción y purificación de α -sarcina y AFP de *Aspergillus giganteus*

Las diferentes etapas de la purificación de la α -sarcina fúngica (Gasset, 1990; Lacadena et al., 1994; Lacadena, 1997) se basan en las descritas cuando se purificó por primera vez esta proteína (Olson y Goerner, 1965). Primeramente, el hongo *A. giganteus* MDH 18894 se creció en el medio líquido adecuado (peptona al 2%, almidón de maíz al 2%, NaCl al 2% y extracto de carne de vaca al 1,5%) a 30 °C durante 70-90 horas. La producción de α -sarcina se registró midiendo la absorbancia a 280 nm y el pH de alícuotas del medio de cultivo tomadas a diferentes tiempos, así como mediante su análisis electroforético en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfatosódico (PAGE-SDS). La α -sarcina se secreta al medio extracelular, así que una vez separado del micelio por filtración en un embudo Büchner con dos capas de papel Whatman 3M, el filtrado se dializó exhaustivamente frente a fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0. La purificación de la proteína comenzó entonces mediante una primera cromatografía de intercambio iónico en una resina Amberlita IRC-50 (Sigma), seguida de dos cromatografías de penetrabilidad en un Biogel P10 y Biogel P2 (Bio-Rad). La Amberlita con la α -sarcina unida se lavó con el tampón de retención sin y con NaCl 0,2 M. Tras estos lavados, se eluyeron las proteínas con el mismo tampón conteniendo NaCl 0,6 M. El conjunto de fracciones que contenían α -sarcina y/o AFP se concentró, normalmente mediante liofilización, y se fraccionó en una columna de Biogel P10 (1,5 x 120 cm), equilibrada en Tris HCl 50 mM, pH 7,0, conteniendo NaCl 0,1 M. En esta cromatografía se separan la α -sarcina, la AFP y la lf-AFP (véase el apartado correspondiente de resultados y discusión). Las fracciones conteniendo cada una de las proteínas se recogieron por separado, se concentraron y se desalaron en Biogel P2, equilibrado en ácido acético 50 mM o NH_4HCO_3 50 mM, pH 7,0. El rendimiento de la purificación, en cuanto a la α -sarcina, osciló entre 5-50 mg/l de medio de cultivo, y entre 5-10 mg/l para la AFP.

Producción y purificación de RNasa U2 de *Ustilago sphaerogena*

Se creció el hongo *Ustilago sphaerogena* CBS 534.71 en 100 ml de PDB, a 30 °C durante una noche. Con ese precultivo se inocularon 3 l de MU que se incubaron a 30 °C durante 100 h. Durante este tiempo se cogieron alícuotas de los distintos matraces, que se analizaron respecto a su actividad

frente a RNA a pH 4,5. El hongo creció de forma desagregada, aunque sin que llegara a ser en forma de «levadura». Excepcionalmente, se observó que crecía formando un micelio en forma de «estrellas» filamentosas, y que producía mucha menor actividad ribonucleolítica.

Se separó el medio de cultivo por centrifugación y filtración con dos capas de papel Whatman 3M en un embudo Büchner, tras lo que se dializó dos veces frente a piperazina 20 mM, pH 6,0. La primera etapa de purificación fue una cromatografía de intercambio iónico, por lo que al medio dializado se le añadieron 10 ml de DEAE-celulosa (DE32 de Whatman), equilibrado en el mismo tampón, y se agitó durante una noche a 4 °C, mediante un agitador de aspas. Este DEAE se montó en una columna, eluyendo la proteína con un gradiente, en el mismo tampón, de 0 a 0,5 M de NaCl. Las fracciones que contenían la actividad frente a RNA a pH 4,5 se recogieron y concentraron utilizando Centriprep-3 (Amicon). La segunda etapa de purificación es una cromatografía de penetrabilidad, que se llevó a cabo en una columna de Sephadex G-75 (Pharmacia), equilibrada en NH_4AcO 50 mM, pH 4,5. Las fracciones con actividad resultantes de esta columna son las que constituyen la proteína purificada.

Producción y purificación de α -sarcina y sus mutantes en *Escherichia coli*

Para la producción de α -sarcina se utilizaron dos vectores de expresión diferentes: pET11b (Novagen), y pINPG, una forma modificada de pINIIIOmpA (Ghrayeb et al., 1984). Las principales características generales de estos plásmidos se describen en el correspondiente apartado de materiales.

Vector de expresión pINPGaS

El sistema de expresión pINPGaS permitió la obtención de α -sarcina nativa y de sus diferentes formas mutantes. Para ello, en general, se crecieron bacterias RB791 conteniendo el plásmido pINPGaS en medio mínimo con ampicilina. La incubación se realizó a 30 °C, durante 16 horas tras la inducción de la expresión por adición de IPTG a 2 mM. Este sistema de expresión produce una proteína de fusión formada por el péptido señal de la proteína OmpA y la α -sarcina, secretándose α -sarcina madura al espacio periplásmico (Lacadena et al., 1994). Una vez finalizado el cultivo, las células se sedimentaron por centrifugación de 20 min a 5000 g. Las células resuspendidas en Tris 33 mM, EDTA 33 mM, pH 7,0 (5 ml/g de células), se sometieron a choque osmótico mediante una primera incubación con sacarosa 40% (5 ml/g de células) a temperatura ambiente y posterior centrifugación; y una segunda incubación en agua fría. De esta forma, se rompió la pared celular, separándose

la fracción periplásmica del sedimento celular mediante centrifugación. Por último, se lisaron las células mediante sonicación y se obtuvo la α -sarcina de la fracción soluble (Lacadena et al., 1994; Lacadena, 1997). Recientemente, este método de producción se ha mejorado, mediante la coexpresión de la α -sarcina con tiorredoxina (García-Ortega et al., 2000). Para ello, se utiliza un plásmido denominado pT-Trx, que confiere resistencia a cloranfenicol y sobreproduce tiorredoxina (Yasukawa et al., 1995). Esto se traduce en un entorno redox que permite multiplicar hasta por 5 veces la cantidad de α -sarcina soluble producida (García-Ortega et al., 2000). El protocolo utilizado es el mismo, con la única variación de que se utilizan células BL21(DE3), que albergan tanto pINPG α S como pT-Trx, y que se añade cloranfenicol (34 μ g/ml) además de la ampicilina.

La purificación de la α -sarcina soluble, a partir de las diferentes fracciones obtenidas, se llevó a cabo mediante una primera etapa cromatográfica de intercambio iónico en Amberlita IRC-50, y dos cromatografías de penetrabilidad en Biogel P10 y Biogel P2, idénticas a las descritas para la purificación de la variedad fúngica. Las fracciones del eluido correspondiente a la α -sarcina se concentraron mediante centrifugación a 4 °C, utilizando el sistema Centriprep-10 de Amicon, hasta lograr el volumen adecuado en cada caso. El rendimiento obtenido en la purificación fue de 1,5-2 mg de α -sarcina por l de cultivo (Lacadena, 1997), o de 8-10 mg/l si se incluye el plásmido pT-Trx (García-Ortega et al., 2000). La proteína purificada se caracterizó a nivel espectroscópico y funcional.

Vector de expresión pET11b α S

A partir del vector comercial pET11b (Novagen), se construyó el sistema de expresión pET11b α S. Los genes que se clonan en los vectores pET se encuentran bajo el control del promotor del fago T7 (Rosenberg et al., 1987). Así, en ausencia de la RNA polimerasa del fago T7 la transcripción y, por tanto, la expresión de los genes, es prácticamente inexistente. Esta característica convierte estos vectores en sistemas de expresión muy útiles para la producción de proteínas tóxicas, como es el caso de la α -sarcina. Consecuentemente, la manipulación del DNA durante el clonaje en este sistema, se realizó utilizando cepas de *E. coli*, como la HB101, que no contienen el gen de la RNA polimerasa del fago T7.

Para la expresión con pET11b α S se utilizó la cepa BL21(DE3), que contiene el gen de la RNA polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. De esta forma, la inducción de la expresión se realiza por adición de IPTG, a una concentración final 0,4 mM, a un cultivo en LB de células con una OD₆₀₀ en torno a 1,0, y mantenimiento del mismo a 37 °C, durante 4 horas. La

expresión en células BL21(DE3) conteniendo el vector pET11baS permite la obtención, al igual que con pINPGaS, de α -sarcina nativa y soluble en la fracción periplásmica. Además, tras el proceso de purificación y caracterización, el rendimiento obtenido es igual al del caso anterior (Lacadena, 1997). Sorprendentemente, este sistema no se pudo compatibilizar con la expresión de tioredoxina (García-Ortega et al., 2000), a pesar de que, en principio, el plásmido pT-Trx fue diseñado para ser coexpresado con los vectores de la serie pET (Yasukawa et al., 1995).

Producción y purificación de α -sarcina en *Pichia pastoris*

La producción de α -sarcina de *P. pastoris* se hizo con las cepas que más proteína extracelular producían, según los ensayos piloto, de aquellas transformadas con los vectores pHIL.D2preaS y pHIL.D2preaS(A-2K) (véase el apartado correspondiente de resultados y discusión). Para ello, se inocularon 2 l de medio semimínimo tamponado, BMGY, con un precultivo hecho en ese mismo medio. Tras dos días de incubación a 30 °C, con abundante aireación, las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 400 ml de BMMY, incubándolos durante dos días más a la misma temperatura, en matraces con muescas y tapados con dos capas de tela Miracloth (Calbiochem), reponiendo el metanol a una concentración del 0,5% (v/v) hasta dos veces al día. En alguna de las purificaciones, las células inducidas durante dos días, tras recoger el caldo de cultivo, se resuspendieron en otros 400 ml de BMMY fresco, repitiendo la inducción por otros dos días.

La purificación se hizo con el mismo esquema que para la proteína producida en *A. giganteus*, a partir de todo el medio extracelular de la(s) inducción(es). Para ello, tras parar el cultivo, se centrifugó para separar las células y el medio extracelular se dializó también frente a tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, con 0,1 M NaCl, realizando el resto de los pasos de purificación de forma idéntica, excepto para la concentración, que se llevó a cabo por ultrafiltración, utilizando Centriprep-10 de Amicon (con un tamaño de selección estimado en 10 kDa).

Producción de RNasa U2 en *Escherichia coli*

Una cepa derivada de W3110, transformada con pINGU2, se creció, tras un precultivo en medio de triptona (TB) con tetraciclina, en 2 l del mismo medio, hasta que el cultivo alcanzó una OD₆₀₀ de 0.4, en que se indujo la producción de RNasa U2 añadiendo 20 ml de L-arabinosa al 10%. Se incubó

a 37 °C hasta el día siguiente en que se recogió el medio de cultivo, separándolo de las células por centrifugación. Se analizó la producción de RNasa U2 mediante ensayo de actividad frente a RNA y zimograma.

Para intentar purificar la RNasa U2 producida, se siguieron los mismos pasos que para la purificación a partir de *U. sphaerogena* o de *P. pastoris*: cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa y de penetrabilidad en Biogel P10. Además, se llevó a cabo una cromatografía de penetrabilidad adicional de tipo FPLC en Superdex 75 HR 10/30 (1 x 30 cm), equilibrada en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, conteniendo NaCl 0,2 M, utilizando un flujo de 0,5 ml/min.

Producción y purificación de RNasa U2 en *Pichia pastoris*

La primera producción de RNasa U2 en *P. pastoris* se hizo de forma similar a la de α -sarcina, utilizando la mejor cepa productora y los medios semimínimos tamponados BMGY y BMMY. Sin embargo, la dificultad de purificarla de componentes no proteicos que permanecían después de las etapas cromatográficas ha hecho que las demás producciones se hayan llevado a cabo utilizando medios mínimos tamponados, BMG y BMM. En este caso, el tiempo de inducción duró 2 o 4 días, al final del cual se recogió el caldo de cultivo separándolo de las células por centrifugación, pero no se volvieron a inducir las mismas células. Se analizó la producción de RNasa U2 mediante ensayo de actividad frente a RNA y zimograma.

Para la purificación de la RNasa U2 obtenida, se utilizó el mismo esquema, con dos etapas cromatográficas, que se utilizó para la purificación de la proteína de *U. sphaerogena*, y que ya se ha descrito.

Fermentación

También se ha intentado la producción de la RNasa U2 por parte de la misma cepa, mediante fermentación, lo que se llevó a cabo en un fermentador Biostat E, con una vasija de cristal y acero de 5,8 l, del Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de esta Universidad, en colaboración con los Drs. Humberto Martín y María Molina. Se siguieron las directrices de Stratton et al. (1998) y de la empresa Invitrogen.

Se creció un preinóculo de 200 ml de YPD con la cepa que se había utilizado en los ensayos de producción, incubándolo durante 24 h. Con este cultivo se inoculó el fermentador, en el que se habían autoclavado 4 l de medio BSM, añadiéndoles en frío 20 ml de PTM₁ y NH₄OH al 25% hasta ajustar el

pH a 5,0 (unos 100 ml). Durante toda la fermentación, se fijó la temperatura en 30 °C, el pH en 5,0 (con adición automática de NH_4OH al 25%), se añadió antiespumante (pluriol) cuando se formó espuma, y se mantuvo la agitación y aireación necesarias para que el oxígeno disuelto fuera al menos del 20%. Se sacaron alícuotas a lo largo de la fermentación, evaluándose la concentración celular mediante peso húmedo y dispersión óptica (OD_{600}), y comprobando que no había contaminaciones mediante observación microscópica. El medio de cultivo, separado por centrifugación, se guardó a -20 °C para determinar posteriormente la actividad ribonucleolítica (frente a RNA de levadura) y la concentración de metanol.

En la primera fase de crecimiento la fuente de carbono fue el glicerol incorporado en el medio. La cantidad de glicerol presente al principio del cultivo es la máxima (4%) para que no sea tóxica. Cuando este se agotó, se realizó una segunda fase, en que se fue alimentando con un flujo continuo de 0,5 ml/min de glicerol al 50% (con un 1% de PTM_1), añadiendo en total 250 ml. Con esta alimentación adicional se consigue multiplicar la densidad celular en el cultivo. La tercera fase es la alimentación con metanol (con un 1% de PTM_1), que es el inductor de la expresión del gen recombinante. Esta fase es distinta según el fenotipo Mut de la cepa utilizada. En este caso, se utilizó una cepa Mut^s, y se aplicó un flujo de metanol de 0,2 ml/min durante toda la fase de inducción. Esta se llevó a cabo durante 110 h. al cabo de los cuales se recogió el cultivo.

La determinación de la concentración de metanol la realizaron Nuria Peña y el Dr. Julio Reviejo, del Departamento de Química Analítica de esta Facultad, utilizando electrodos amperométricos compósitos de grafito-teflón en cuya matriz se incorporaron peroxidasa de nabo y alcohol oxidasa de *P. pastoris*, en condiciones similares a las descritas para otros biosensores semejantes (Serra et al., 1999).

9.- Caracterización de las proteínas purificadas

Espectros de absorción en la región UV-visible

Las medidas espectroscópicas se realizaron bien en un espectrofotómetro Beckman DU7 o bien en uno Uvikon 930. Para ello se emplearon cubetas de cuarzo de paso óptico de 0,1 y 1,0 cm, dependiendo del volumen y concentración de la muestra. La concentración de las proteínas se calculó a partir de sus coeficientes de extinción (tabla 9).

Tabla 9: Coeficientes de extinción de las proteínas utilizadas

Proteína	$E^{0,1\%}$ (280 nm, $l \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$)	Referencia
α -sarcina nativa	1,34	Gavilanes et al., 1983
H50Q	1,27	Lacadena et al., 1999
E96Q	1,34	Lacadena et al., 1999
H137Q	1,34	Lacadena et al., 1995
H50/H137Q	1,27	Lacadena et al., 1999
H50/137/E96Q	1,27	Lacadena et al., 1999
AFP	1,76 ^a	Este trabajo
If-AFP	1,59 ^a	Este trabajo

^a $E^{0,1\%}$ (278 nm)

Espectros de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se realizaron en un dicrógrafo Jobin-Yvon Mark III o en un espectropolarímetro Jasco J-715. Las disoluciones de proteína se analizaron en cubetas de 0,01 a 0,1 cm de paso óptico en la región del UV lejano (menos de 250 nm) y de 1 cm en el UV próximo (350-250 nm). Los resultados se expresan como valores de elipticidad molar por residuo de aminoácido (Θ_{MRW}) en unidades de grado \times $cm^2 \times dmol^{-1}$, tomando para la α -sarcina y la AFP 113 como masa molecular promedio por residuo, y 109 para la RNasa U2, deducido de sus respectivas secuencias (Sacco et al., 1983; Nakaya et al., 1990; Sato y Uchida, 1975a; Kanaya y Uchida, 1986 y 1995). La concentración de proteína empleada para las medidas en las regiones del UV lejano y próximo se mantuvo comprendida en los intervalos 0,1-0,5 mg/ml y 0,5-1,0 mg/ml, respectivamente. La concentración de proteína fue determinada por medidas de absorbancia, o bien mediante análisis de aminoácidos.

Espectros de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro SLM Aminco 8000C, equipado con una lámpara de arco de xenón de 450 W, empleando cubetas de 0,2 ó 0,4 cm de paso óptico. Las medidas fueron realizadas a 25 °C. La anchura de rendija fue de 4 nm, tanto para el haz de excitación como para el de emisión. El voltaje de los canales se ajustó en cada

caso de modo que la señal recibida se encontrase siempre entre los límites óptimos aconsejados.

Análisis de aminoácidos

Los análisis de aminoácidos se llevaron a cabo con un analizador automático Beckman Modelo 6300. Las muestras se hidrolizaron en HCl 5,7 N con fenol 0,1% (p/v) y *nor*-leucina como estándar interno (0,2 ml volumen total) durante 24 horas a 110 °C, en tubos cerrados a vacío. Posteriormente las muestras se secaron, lavándose a continuación dos veces con 0,2 ml de agua destilada. Los hidrolizados secos se disolvieron en 50 µl de tampón Na-S (Beckman) y se aplicaron en el analizador.

Secuenciación automática

La secuencia del extremo amino de las distintas formas de α -sarcina producidas en *P. pastoris*, así como de la AFP y la lf-AFP, se determinó en el Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo, por parte del Dr. Carlos López-Otín, mediante degradación automática de Edman, en un secuenciador de fase gaseosa Applied Biosystems modelo 477A, utilizando el programa estándar y en presencia de polibreno (Tarr et al., 1978). Los derivados feniltiohidantóinicos (PTIH) de los aminoácidos fueron identificados y cuantificados mediante un analizador de PTH, modelo 120A, de la misma casa comercial (Hewick et al., 1981).

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) para determinar la pureza de muestras proteicas y la masa molecular de las proteínas presentes (Shapiro et al., 1967), utilizando sistemas de electroforesis en placa de la marca Bio-Rad, con un porcentaje de poliacrilamida:bisacrilamida (30:1) al 15-17%, y en presencia de SDS al 0,1% (p/v). Las muestras se disolvieron en tampón de aplicación, compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 7,6, EDTA 2 mM, SDS 1% (p/v), glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0,02% (p/v), al que se le añadió, cuando se querían reducir las muestras, 2-mercaptoetanol al 5% (v/v) o ditiotreitól (DTT: p/v) al 0,2%, y se desnaturalizaron calentando a 80 °C durante 20 min, en el caso de muestras que no se querían reducir, y 15 min a 95 °C para reducirlas. Las electroforesis se corrieron con una corriente constante de 25 mA por gel

hasta que se salía el azul de bromofenol (generalmente 45 min), y se tiñeron con azul de Coomassie.

Inmunodetección de α -sarcina y AFP

Los anticuerpos frente a α -sarcina y AFP se obtuvieron a partir de suero de conejos, a los cuales se les habían inyectado varias dosis de 100 μ g de la proteína correspondiente, purificada a homogeneidad. Esta obtención de anticuerpos se realizó en la Clínica de la Concepción (Fundación Jiménez Díaz) gracias a la colaboración del Dr. Fernando Vivanco. La purificación parcial de los mismos se llevó a cabo en dos etapas. En la primera, se obtuvo la fracción de IgG mediante una precipitación con sulfato amónico en condiciones estándar. En la segunda, se procedió a la inmunoprecipitación de la población «inespecífica», al añadir un lisado de *E. coli* a una mezcla del correspondiente suero con PBS-Tween 20 al 0,05% (v/v). La precipitación se realizó por incubación durante 2 h a 4 °C, durante las cuales se mantuvo una constante agitación suave, y posterior centrifugación a 10 000 g. Esta operación se realizó dos veces. El lisado de *E. coli* se obtuvo tras sonicación exhaustiva de un cultivo saturado de células conteniendo el plásmido adecuado, sin el correspondiente gen de la proteína recombinante. Los anticuerpos así obtenidos se guardaron alicuotados y congelados a -20 °C.

La inmunodetección se llevó a cabo mediante transferencia de las proteínas contenidas en un gel de PAGE-SDS a una membrana Immobilon (Millipore). La transferencia se realizó en un aparato de transferencia LKB, durante 1 h a 0,9 mA/cm² de gel, en tampón Tris 48 mM, Gly 39 mM, SDS 0,0375% (p/v) y metanol 20% (v/v). Posteriormente, la membrana se saturó en PBS con leche en polvo desnatada al 3% (p/v) durante 2 h. A continuación, se incubó con anticuerpos frente a α -sarcina o AFP, convenientemente diluidos, durante 3 h. Tras un lavado con PBS-Tween al 0,5% (v/v), se incubó la membrana con un anticuerpo específico para la fracción constante de las IgG de conejo (Bio-Rad), diluido 1/3000 en PBS-leche al 0,1% (p/v), durante 1 h a temperatura ambiente. Estos anticuerpos se encuentran combinados con peroxidasa lo que permite visualizarlos al añadir el reactivo correspondiente, que se vuelve coloreado bajo la acción de la enzima. El revelado se realizó por adición de la solución de revelado que contiene tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencimidina (DAB) 0,03% (p/v) y H₂O₂ 0,016% (v/v) en tampón PBS. Una vez aparecidas las bandas coloreadas, la reacción se paró por inmersión en agua destilada.

Detección de proteínas glicosiladas

Este experimento se llevó a cabo para detectar la presencia de proteínas glicosiladas en medios extracelulares obtenidos a partir de cultivos de *Pichia pastoris*. Este ensayo se basa en la reacción de la concanavalina A con los restos de manosa de las proteínas glicosiladas (Hsi et al., 1991). Las condiciones en que se hizo son las descritas por Batanero et al. (1994).

Las muestras de los medios extracelulares se aplicaron en geles de poliacrilamida al 17%, en presencia de SDS al 1%. Después de realizada la electroforesis, uno de los geles se tiñó con azul de Coomassie, y con el otro, en el que se habían aplicado por duplicado las muestras, se procedió a una transferencia a Immobilon como ya ha sido descrita. Esta membrana de Immobilon con las proteínas transferidas se dividió en dos partes iguales. En una de ellas se llevó a cabo una inmunodetección, revelando aquellas bandas que reaccionan con los anticuerpos frente a la α -sarcina. La otra parte de la membrana se sumergió en solución fijadora (TBS con 2% polivinilpirrolidona) durante una hora, incubándose después una hora con concanavalina A biotinilada (10 μ g/ml) en TBS con 2% polivinilpirrolidona. La membrana se lavó entonces con TBS con 0,1% Triton X-100, y se incubó con el reactivo ABC de Vectastain (avidina y peroxidasa de nabo biotinilada), diluido 1:400 en TBS con 1% polivinilpirrolidona, durante 30 min. La concanavalina A, unida a las glicoproteínas, se reveló con 0,05% (p/v) 3,3'-diaminobencidina-HCl y 0,03% (v/v) H_2O_2 en TBS, hasta observar las bandas de color. Se detuvo entonces la reacción sumergiendo la membrana en agua.

Reducción y carboxiamidometilación

Para reducir los cuatro puentes disulfuro de la AFP, y mantenerlos separados mediante la carboxiamidometilación de los grupos tiólicos expuestos, se desnaturalizó la AFP (a 10 mg/ml) mediante incubación durante 1 h a 37 °C en tampón Tris-HCl, pH 8,0, conteniendo EDTA 2 mM y cloruro de guanidinio 6 M. Para reducir los puentes, se añadió DTT a una concentración final 70 mM (aproximadamente 10 veces más cantidad molar que los puentes a reducir), incubándose a 37 °C durante 90 min. Se añadió entonces yodoacetamida a una concentración final 0,7 M, incubándose en oscuridad 120 min a 37 °C. La proteína se purificó entonces mediante cromatografía de penetrabilidad en una columna de Biogel P2 (Bio-Rad) equilibrada en HAcO 50 mM, y se liofilizó. El contenido de carboximetilcisteína en la proteína modificada se determinó mediante análisis de aminoácidos.

Digestión con proteasas

Entre 10 y 50 nmol de AFP nativa se utilizaron en cada tratamiento proteolítico, según las condiciones expuestas en la tabla 10, utilizando enzimas compradas a Boehringer Mannheim, excepto la tripsina, que era de Worthington.

Tabla 10: Condiciones de digestión de AFP con distintas proteasas

Proteasa	Relación en peso enzima:sustrato	Tampón	Incubación	Otros tratamientos
Tripsina	1:100	NH_4HCO_3 0,3 M, pH 8,0	37 °C, 24 h	
SV-8	1:20	NH_4HCO_3 0,1 M, pH 8,0, EDTA 2 mM	30 °C, 24 h	
Termolisina	1:6	NH_4AcO 0,5 M, CaCl_2 0,2 mM	65 °C, 3 h ó 80 °C, 16 h	
Proteinasa K	1:5		37 °C, 24 h	*
Pronasa	1:5		37 °C, 24 h	*
Pepsina	1:20	TFA 0,1%	37 °C, 16 h	**
Carboxi-peptidasa Y	1:50	N-metilmorfolina 0,2 M, pH 8,1	37 °C	†
Subtilisina	1:2	NH_4HCO_3 50 mM, pH 8,5, sin Ca^{2+}	37 °C, 3 h	

* La AFP se disolvió en Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, CaCl_2 10 mM, NaCl 150 mM, y se hirvió durante 30 min, tras lo cual se enfrió en hielo antes de echar la enzima.

** Previamente, la AFP se hirvió durante 30 min.

† Se cogieron alícuotas a 2, 15, y 24 h de reacción, que se precipitaron por adición de sulfosalicilato al 50% y NaOH 1 M, analizándose el contenido en aminoácidos de los sobrenadantes.

HPLC en fase inversa

La cromatografía mediante RP-HPLC, tanto de la AFP como de las formas de α -sarcina purificadas de *P. pastoris*, se llevó a cabo en un aparato *System Gold* de Beckman, con una columna *Ultrasphere* (5 μm) de Beckman, eluyendo la proteína con un gradiente lineal entre 0 y 25% de B en 30 min, con

un flujo de 1 ml/min. El disolvente inicial era TFA al 0,1%, B era TFA al 0,1% en acetonitrilo.

Determinación de la masa molecular por cromatografía de penetrabilidad

Se determinó la masa molecular de la AFP y la lf-AFP nativas mediante cromatografía de penetrabilidad en un sistema FPLC (Pharmacia), con una columna Superdex 75 HR 10/30 (1 x 30 cm), equilibrada en fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, conteniendo NaCl 0,2 M, utilizando un flujo de 0,5 ml/min y una mezcla de proteínas de masas moleculares conocidas: albúmina de suero bovino (66,2 kDa), ovoalbúmina (45,0 kDa), mioglobina (17,8 kDa) y citocromo C de caballo (12,3 kDa).

Programas bioinformáticos utilizados

Las estructuras tridimensionales de las proteínas se visualizaron y estudiaron con los programas Rasmol (www.umass.edu/microbio/rasmol/), Chime (www.mdli.com/download/chime20down.html), *Swiss PDB viewer* (Guex y Peitsch, 1997; www.expasy.ch/spdbv/), Insight II (Biosym Technologies) o MolMol (www.mol.biol.ethz.ch/wuthrich/software/molmol/), utilizando las coordenadas del PDB o las proporcionadas por el Grupo de Espectroscopía de RMN del Instituto de Estructura de la Materia del CSIC, antes de que fueran depositadas en dicha base de datos.

El alineamiento de secuencias de DNA o proteínas se llevó a cabo con el paquete GCG 9 (Wisconsin Group), o mediante el programa ClustalW (Thompson et al., 1994a) instalado en el servidor del *European Bioinformatics Institute* (EBI; www2.ebi.ac.uk/clustalw/). El alineamiento según la estructura tridimensional se ha hecho con el *Swiss PDB viewer* (Guex y Peitsch, 1997; www.expasy.ch/spdbv/). La edición gráfica de los alineamientos se ha realizado con el programa GeneDoc (www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml).

Se construyó un árbol filogenético con las secuencias de DNA de las ribotoxinas obtenidas, y con los fragmentos equivalentes de las ya conocidas, utilizando el programa WET (Javier Dopazo, TDI S.A.), mediante el método UPGMA a partir de una matriz de distancias de Jukes y Cantor realizada por el mismo programa.

El árbol filogenético de las RNAsas microbianas extracelulares, se ha realizado en el servidor del EBI, al realizar el alineamiento de las secuencias

de proteínas de las proteínas maduras con ClustalW (www2.ebi.ac.uk/clustalw/).

La predicción de la existencia de un péptido señal y su sitio de corte se hizo con el servidor SignalP (Nielsen et al., 1997; www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), utilizando la red entrenada con secuencias eucariotas. La predicción de sitios de glicosilación en O se realizó con el servidor NetOGlyc (Hansen et al., 1998; www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/)

10.- Ensayos de actividad antifúngica

Los ensayos de actividad antifúngica y antibacteriana de la AFP y la lf-AFP los llevaron a cabo la Dra. Belén Patiño y la Prof. Covadonga Vázquez, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense, mediante el método de dilución en agar, utilizando distintos medios en función de los organismos ensayados (tabla 11): PDA (agar de patata y dextrosa) para hongos filamentosos, YMA (agar de morfología de levaduras) para las levaduras, y agar de Müller-Hinton para bacterias.

Se prepararon suspensiones de los microorganismos en agua estéril conteniendo 10^3 cfu/ml (cfu: unidades formadoras de colonias), que se utilizaron para inocular los cultivos. Se utilizaron concentraciones de AFP desde 0,006 hasta 1,133 mg/ml, incubándolas con los hongos y levaduras a 30 °C durante 48-72 h, o con las bacterias a 32 °C durante 24 h. La concentración mínima inhibitoria (MIC) se define como la concentración de antimicrobiano que causaba la inhibición completa del crecimiento después de estos periodos de incubación.

11.- Ensayos de actividad ribonucleolítica

Se han utilizado dos tipos de ribonucleasas en esta Tesis: unas, las ribotoxinas, son muy específicas, pero poco efectivas frente a RNA «desnudo»; la otra, la RNasa U2, es mucho menos específica, pero mucho más activa frente al RNA en general. Por ello, a pesar de que compartan un mismo tipo de actividad catalítica, ha habido que emplear una muy diversa variedad de ensayos, adaptándolos para los dos tipos de RNasas.

Tabla 11: Microorganismos usados en ensayos de actividad antifúngica

Organismo	Número(s) de colección
<i>Trichoderma koningii</i>	IJFM A219
<i>Trichoderma harzianum</i>	IJFM A217
<i>Penicillium purpurogenum</i>	IJFM A575
<i>Fusarium oxysporum</i>	Fot 1a, Fot 1b, Folr 2, Forl 13 y Fol 39-87
<i>Penicillium frequentans</i>	IJFM A569
<i>Penicillium chrysogenum</i>	IJFM A575
<i>Penicillium chrysogenum</i>	CECT 2306
<i>Aspergillus niger</i>	IJFM A483
<i>Aspergillus flavus</i>	JB 1147
<i>Aspergillus flavus</i>	JB 1057
<i>Aspergillus giganteus</i>	MDH 18894
<i>Candida albicans</i>	CYC 1146
<i>Rhodotula mucilaginosa</i>	CYC 1024
<i>Pichia membranifaciens</i>	CYC 1070
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CYC 1058
<i>Saccharomyces exiguus</i>	CYC 1057
<i>Salmonella enteritidis</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Micrococcus luteus</i>	
<i>Serratia marcescens</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	

Todos los microorganismos se obtuvieron de la colección del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense, excepto *A. giganteus*, que fue una donación del Dr. Y. Endo (Universidad de Ehime, Japón).

No es fácil disponer de un ensayo de actividad sencillo y cuantitativo para las ribotoxinas. El sustrato natural sería en ese caso el ribosoma, en el que rompe un sólo enlace fosfodiéster. Esta reacción con el ribosoma es, de hecho, su ensayo más específico y característico, y se usa en nuestro laboratorio desde hace tiempo como control de la actividad específica de las ribotoxinas producidas, tanto silvestres como mutadas. Durante el trabajo que aquí se presenta, se ha adaptado este ensayo, además, para detectar la producción de ribotoxinas en cultivos de hongos. Otros grupos utilizan también un ensayo con un oligorribonucleótido sintético de 35 bases, que contiene la secuencia del lazo de sarcina/ricina (SRL), y que se marca radiactivamente al sintetizarlo. Tras la reacción con la ribotoxina, se separan los dos fragmentos de RNA

mediante electroforesis, pudiendo cuantificarse las bandas de la autorradiografía (Endo et al., 1990 y 1991). Sin embargo, es un ensayo muy laborioso en su realización y muy caro, además de no aportar apenas ventajas, por lo que no se ha usado en los experimentos descritos en esta Tesis.

Las ribotoxinas, aunque algo especiales, son ribonucleasas. Y este grupo de enzimas ha sido ampliamente estudiado, por lo que se han desarrollado muchos ensayos de actividad posibles, que han permitido además estudiar con detalle su mecanismo catalítico. Sin embargo, este tipo de ensayos con sustratos ribonucleicos menos específicos no se habían usado apenas para las ribotoxinas, por lo que una de las tareas del trabajo que aquí se describe ha sido la de adaptar alguno de ellos para su utilización con las ribotoxinas. Por ejemplo, la reacción frente a homopolinucleotidos, combinada además con la electroforesis en presencia de SDS, lo que resulta en el llamado zimograma. El otro es la reacción con el sustrato más simple, un dinucleotido, en la que para detectar los productos formados ha habido que recurrir a la separación por cromatografía.

Actividad frente a ribosomas

La actividad ribonucleolítica de la α -sarcina se determinó por la liberación del fragmento α , tras incubación de la α -sarcina con un lisado de reticulocitos de conejo libre de células (de la marca Promega), como describen Lamy y Davies (1991). Este lisado (50 μ l) se trató con 20-100 ng de α -sarcina nativa en tampón Tris-HCl 40 mM, KCl 40 mM, EDTA 10 mM, pH 7,5, durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se paró por adición de 0,25 ml de Tris-HCl 50 mM, SDS 0,5% (p/v), pH 7,5, incubándose la mezcla 5 minutos a temperatura ambiente. La extracción del RNA se realizó en fenol saturado en agua y posteriormente se precipitó con alcohol isopropílico. Este RNA se analizó en gel de agarosa al 2,4% (p/v) en tampón TAE con formaldehído al 16% (v/v) y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio.

Adaptación para esporas de hongos

Con esta adaptación se pretendió desarrollar un método rápido de análisis de la presencia de ribotoxinas en cepas de hongos filamentosos, intentando detectar su actividad específica, por la liberación del fragmento α (Schindler y Davies, 1977), aunque a veces esto no es posible por la presencia

de otras actividades ribonucleolíticas, menos específicas, que degraden en mayor medida el rRNA.

Para recoger las conidiosporas, se agitaron cultivos de los hongos en PDA en tubos inclinados con una solución de Tween-80 al 0,01%. Las suspensiones así formadas se agitaron exhaustivamente y se centrifugaron brevemente. Se incubaron 3 μ l del sobrenadante con 3 μ l de lisado de reticulocitos de conejo (Promega), durante 5 min a 37 °C, parándose la incubación con 0,5 μ l de SDS al 10%. Para extraer el RNA, se añadieron 7 μ l de PC1 y 20 μ l de TE, pH 8,0, siempre mezclándolo bien. Tras centrifugar, se cogieron 15 μ l de la fase acuosa superior, que se mezclaron con 0,5 μ l de tampón de aplicación de electroforesis, incubándolo a 95 °C durante 5 min. con la tapa abierta (procurando siempre que no se seque la muestra). Las muestras así preparadas se aplicaron en un gel de agarosa al 2 % para electroforesis, observándose los distintos RNA, incluido el fragmento α . Se hicieron también controles sin muestra, y con 50 ng de mitogilina, purificada según está descrito (Kao y Davies, 1995).

Zimograma frente a homopolinucleotidos

La detección in situ de la actividad de enzimas previamente separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida se ha utilizado desde hace varias décadas para proteínas muy distintas. Este tipo de ensayos se conocen como «zimogramas». Este método presenta varias ventajas, pues un sólo ensayo puede servir para analizar, además de la cantidad de enzima presente, su homogeneidad o su posible contaminación por actividades similares, aunque estén presentes en muy pequeña proporción. Además, se puede usar tanto para extractos biológicos crudos como para las enzimas purificadas.

Sin embargo, cuando la electroforesis se hace en presencia de SDS, en condiciones desnaturalizantes, hay una dificultad añadida para poder realizar este tipo de detección, que es la necesidad de renaturalizar la enzima, lo que no siempre es posible. En el caso de las ribonucleasas, especialmente las secretadas y consideradas como «digestivas» (p. ej. las de la superfamilia de la RNasa A en mamíferos o las de la T1 y T2 en microorganismos), como suelen ser enzimas muy estables y fácilmente replegables (al menos, si no se reducen sus puentes disulfuro), se han podido desarrollar con cierta facilidad este tipo de ensayos.

Se habían descrito en la década de los ochenta de forma detallada (aunque ya se usaban desde antes) dos tipos de zimograma para RNasas. En

uno de ellos se colocaba encima del gel, tras la electroforesis, una capa de agarosa con el RNA embebido. Tras una incubación, se detectaba el RNA no degradado que permanecía en la agarosa (Thomas y Hodes, 1981). Este método ha sido aplicado durante esta década para zimogramas tras isoelectroenfoque, utilizando bromuro de etidio embebido en la agarosa con el RNA, para detectar las actividades de RNasa (Yasuda et al., 1992; Nadano et al., 1993) o de su inhibidor, poniendo el contacto el gel y la agarosa con una membrana impregnada de RNasa (Nadano et al., 1995).

El otro método consiste en embeber el RNA directamente en el gel de poliacrilamida donde, dado su gran tamaño, no se desplaza durante la electroforesis, tras la cual hay que eliminar el SDS para renaturalizar las proteínas, e incubarlo en un tampón y a una temperatura adecuados. El RNA no degradado se detecta por tinción con un colorante de ácidos nucleicos, como el azul de toluidina. Este método fue descrito en detalle por Blank et al., que utilizaron el isopropanol en disolución acuosa tamponada para eliminar eficazmente el SDS (Blank et al., 1982). Estos autores también utilizaron distintos RNA para detectar RNasas de distinta especificidad (Blank et al., 1975). Más recientemente, el grupo de ribonucleasas de la Universidad Autónoma de Barcelona ha desarrollado más posibilidades prácticas de este ensayo (Bravo et al., 1994)

Se planteó la posibilidad de adaptar este ensayo para la α -sarcina, lo que sería de utilidad, tanto para determinar la presencia de la enzima al producirla en sistemas de expresión nuevos, como *E. coli* o *P. pastoris*, como para determinar su grado de pureza, especialmente en lo que concierne a pequeñas contaminaciones por otras RNasas menos específicas pero mucho más activas frente a RNA (esto era especialmente importante para poder llevar a cabo ensayos de actividad catalítica con sustratos distintos del ribosoma). Este ensayo también permitió evaluar la capacidad catalítica de los distintos mutantes de α -sarcina (siempre contando con las limitaciones del método, entre las cuales está el necesario paso de renaturalización de la enzima), así como compararla con otras ribotoxinas.

El método descrito por Blank et al. ya se había usado en nuestro Departamento para detectar RNasas, tanto ácidas como alcalinas (García Segura, 1985), por lo que fue un buen punto de partida para aplicarlo al caso de las ribotoxinas. A la hora de elegir el sustrato, había que considerar la especificidad de la α -sarcina frente a RNA «desnudo», en el que corta tras bases púricas, adenina o guanina (Endo et al., 1983). Por tanto, parecía mejor, para intentar aumentar la capacidad de detección, utilizar un homopolinucleótido de bases púricas, en vez de RNA aislado de fuentes biológicas. Así, ha usado

sobre todo ácido poliadenílico, poli(A), aunque también se ha probado recientemente ácido poliinosínico, poli(I), cuya respuesta es mejor (Kao et al., 1998). En los primeros ensayos se hizo la incubación catalítica (paso 4) a pH 7,5; desde que se descubrió que la α -sarcina era una RNasa ácida, se han hecho incubando a pH 4,5. Así, se han conseguido detectar hasta 0,1 μ g de α -sarcina pura, aunque las bandas se ven mejor aplicando entre 0,5 y 1,0 μ g.

También se ha utilizado este ensayo para el estudio de la RNasa U2. Como ésta también tiene especificidad por bases púricas y su pH óptimo es ácido, se ha usado también poli(A) y tampón acetato a pH 4,5, aunque se obtiene una sensibilidad mayor, dada su mayor actividad específica frente al RNA.

Procedimiento

Los geles se prepararon como habitualmente para PAGE-SDS, pero añadiendo el homopolinucleótido, poli(A) o poli(I), a 0,3 mg/ml en el gel separador. Las muestras se prepararon en el tampón de aplicación de electroforesis habitual, pero sin agente reductor, y se calentaron a 80 °C durante 20 min, y la aplicación y desarrollo de la electroforesis fueron los usuales. Para la detección de las actividades ribonucleolíticas, el gel se sometió a las siguientes incubaciones, utilizando unos 100 ml de cada solución:

1. 2 x 15 min en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, temperatura ambiente.
2. 2 x 15 min en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, 25% isopropanol, temperatura ambiente
3. 2 x 15 min en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, temperatura ambiente
4. 1 h, en Tris-HCl 0,1 M, pH 7,5, ó NaAcO 0,1 M, pH 4,5, 37 °C.
5. 10 min, en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, temperatura ambiente
6. 15 min en azul de toluidina 0,2% en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, temperatura ambiente
7. Lavados con agua para desteñir, hasta conseguir el grado de contraste adecuado.

Se ha observado que el primer paso se puede eliminar, sin perjuicio de los resultados obtenidos.

Actividad frente a RNA de levadura

Este ensayo de actividad ribonucleolítica se basa en la medida de la producción de pequeños oligonucleótidos o mononucleótidos solubles en medio ácido, en presencia de acetato de uranilo, ya que el RNA de gran tamaño

precipita (MacFayden, 1934). El sustrato empleado fue RNA de levadura repurificado mediante sucesivas precipitaciones en acetato de sodio. Este mismo ensayo se puede hacer también sin la sal de uranilo, en cuyo caso precipitan oligonucleotidos de mayor tamaño; de hecho, el tamaño límite por encima del cual se produce la precipitación depende de la acidez del medio, de la concentración de la sal de uranilo y de la composición de bases del oligonucleotido concreto (Dickman y Trupin, 1959). En esta Tesis, este ensayo se ha utilizado únicamente para la RNasa U2, ya que la α -sarcina presenta una respuesta muy pobre (Martínez del Pozo et al., 1989).

Procedimiento

En esencia se ha seguido el método descrito por Blackburn et al. (1977) con ligeras modificaciones, para poder comparar mejor la actividad específica con la descrita anteriormente para la RNasa U2 (Rushizky et al., 1970). La mezcla de incubación estándar estaba formada por 50 μ l de tampón 0,5 M KCl, 0,25 M NaAcO, 0,25 M Tris-HCl, 25 mM EDTA (normalmente a pH 4,5, para medir la actividad de la RNasa U2; cuando se midió actividad de RNasa U1 en la purificación a partir de *Ustilago sphaerogena*, se hizo a pH 7,5), 25 μ l de agua y 25 μ l de una disolución de albúmina de suero bovino al 0,1% (p/v) en agua destilada. A esta mezcla se añadieron 25 μ l de la muestra a medir. Siempre se hicieron duplicados de cada muestra.

La mezcla (125 μ l) se preincubó a 37 °C durante al menos 5 minutos. Después se comenzó la reacción por adición de 125 μ l de una disolución de RNA de levadura a 4 mg/ml en agua destilada y una rápida y enérgica agitación, tras la cual se incubó a 37 °C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción añadiendo 250 μ l de ácido perclórico al 10% (v/v), conteniendo acetato de uranilo al 0,25% (p/v), mantenido en hielo y usado como agente precipitante. La suspensión resultante se agitó vigorosamente y se mantuvo en baño de hielo durante al menos 30 minutos. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugaron a 14 000 g durante 15 min a 4 °C. Se tomaron 400 μ l del sobrenadante obtenido y se diluyeron 10 veces con agua destilada, midiéndose su absorción a 260 nm. A este valor se le restó la absorbancia de una disolución resultante de sustituir, en el proceso seguido, la muestra por agua destilada o tampón (que suele dar una A_{260} en torno a 0,15).

Unidades de actividad

Se definen 100 unidades de actividad como la cantidad necesaria de enzima para producir una variación de A_{260} de 1, en las condiciones arriba descritas. Esto es, para calcular las unidades de actividad se multiplicó por 100 el valor de la variación de absorbancia obtenido respecto al ensayo en blanco. La linealidad del ensayo se mantenía, al menos hasta valores de A_{260} bruta (sin

restar la del ensayo en blanco) de 0.6 (figura 18). Cuando la A_{260} es mayor de ese valor, se puede evaluar el ensayo para comparar unas muestras con otras del mismo ensayo, pero no se puede cuantificar bien la actividad presente.

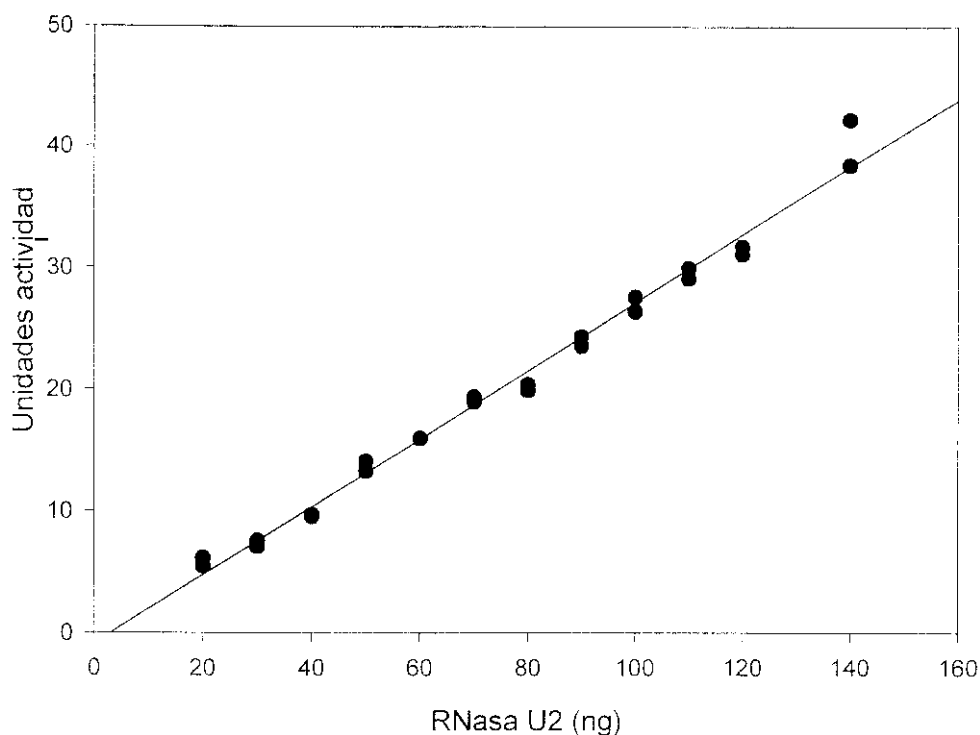


Figura 18: Linealidad del ensayo de actividad frente a RNA de levadura para distintas cantidades de RNasa U2.

La actividad específica se calculó dividiendo por la A_{280} de la muestra, o por la concentración másica de proteína, determinada por análisis de aminoácidos.

Preparación del sustrato

Con el fin de optimizar las condiciones del ensayo de actividad, el sustrato se sometió a un proceso de purificación (García Segura, 1985). Con ello se pretende eliminar los contaminantes presentes en el RNA comercial (iones, glucanos, etc) así como fragmentos de RNA de pequeño tamaño molecular, que alteran la valoración de la actividad de RNasa.

El método de purificación es el que se detalla a continuación: 100 g de RNA de levadura *Torula* (tipo VI de Sigma) se disuelven lentamente en 500 ml de agua destilada. Para posibilitarlo se añaden alícuotas de NaOH 1 M, de manera que el pH final sea próximo a la neutralidad, y procurando que en

ningún caso el pH se eleve por encima de 9,0. Durante todo el proceso, el medio se mantiene a 0-4 °C en baño de hielo. La disolución neutralizada se enrasa a 1 litro con agua destilada y se somete a precipitación salina, por adición de acetato sódico y ácido acético hasta una concentración final 3 M de acetato sódico y un pH de 5,5. De esta forma se obtiene una suspensión de color pardo, que se mantiene a -20 °C durante una noche. El gel formado se recoge por centrifugación (13000 g, 30 minutos, -20 °C) y se redisuelve en 1 litro de agua destilada. El proceso de precipitación se repite dos veces más. El precipitado finalmente obtenido se redisuelve en 500 ml de agua destilada, y se le añade 1 litro de etanol, previamente enfriado a -20 °C. La suspensión resultante se mantiene a esta temperatura durante una noche. El precipitado blanco se recoge mediante centrifugación en las condiciones ya descritas, se redisuelve en EDTA 25 mM y se dializa frente a 20 volúmenes del mismo medio (2 cambios x 6 horas). A continuación, se dializa frente a 20 volúmenes de NaCl 0,15 M (2 cambios x 6 horas) y, por último, frente a 20 volúmenes de agua destilada (3 cambios x 6 horas). El material dializado se liofiliza (se obtuvieron 2,8 g) y se conserva en este estado, a -20 °C, hasta su utilización.

Actividad frente a dinucleótidos

Para cuantificar la actividad de las RNasas utilizadas en este trabajo también se han empleado dinucleótidos (ApA y GpA) como sustrato. Es importante destacar que en este tipo de ensayo se está analizando la capacidad mínima de estas enzimas para hidrolizar un enlace fosfodiéster. Ambas enzimas, en condiciones naturales, actúan frente a un polirribonucleótido. Es decir, se debe asumir que cuando se emplearon estos ensayos lo que se analizó fueron las características esenciales, mínimas, que permiten a la RNasa U2 y a la α -sarcina romper enlaces fosfodiéster del RNA.

En el caso de utilizar el ensayo para determinar las constantes catalíticas de la RNasa U2 purificada, se usó la reacción con ApA, registrando la variación espectrofotométrica de la misma, según describen Yasuda e Inoue (1982). Esta determinación no es posible con la α -sarcina, dada la escala de tiempo en que transcurre la reacción.

Las reacciones se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, registrando la A_{262} en un espectrofotómetro Beckman DU640, equipado con un portacubetas con sistema Peltier, para termostatizar la cubeta, a 25 °C. El volumen total de reacción era de 800 μ l, aplicando primero 400 μ l de tampón NaAcO 50 mM, pH 4,5, conteniendo NaCl 0,1 M, la cantidad deseada de ApA en tampón NaAcO 50 mM, pH 4,5 (sin NaCl), y el volumen del mismo

tampón necesario para sumar 780 μl . Se registró la A_{262} durante un minuto aproximadamente para comprobar que era estable, tras lo cual se añadió la enzima en 20 μl del tampón sin NaCl, registrándose la A_{262} durante 10 min. Se usaron concentraciones de enzima en la reacción en torno a 200 nM. La concentración de ApA se determinó a partir del espectro de absorbancia, utilizando un coeficiente de extinción molar $\epsilon_{260}=28225 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, y se usaron en las reacciones concentraciones entre 10 y 60 μM y cubetas de distintos pasos ópticos para evitar que la absorbancia fuese mayor de 1,0.

La velocidad de cada reacción se calculó a partir de la pendiente, según la variación del coeficiente de extinción, $\Delta\epsilon_{262}=4320 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, calculado en condiciones similares (Yasuda e Inoue, 1982). Se hicieron reacciones por duplicado para distintas concentraciones de sustrato, manteniendo fija la concentración de la enzima. Previamente, se había comprobado que para ese intervalo de concentraciones de sustrato la velocidad era directamente proporcional a la cantidad de enzima añadida. La constante de Michaelis (K_M) y la velocidad máxima ($v_{\text{máx}}$) se calcularon según el modelo de Michaelis-Menten, ajustando mediante regresión no lineal, usando el programa SigmaPlot v5.0 (Jandel), los valores obtenidos a la ecuación hiperbólica.

En el caso de la α -sarcina y de sus diferentes mutantes, como se describe en el apartado de resultados y discusión, hubo que adaptar un método de separación por HPLC, a partir del descrito por Shapiro et al. (1986). Esta forma de medir la reacción tiene el inconveniente de que lleva mucho tiempo pero presenta la ventaja de que se puede cuantificar la aparición de cada uno de los productos, por separado.

Los tampones empleados para la reacción fueron Tris-HCl, fosfato de sodio o acetato de sodio en concentración 50 mM, conteniendo 0,1 M NaCl y 5 mM EDTA, ajustados al pH necesario. En el tampón se disolvía la enzima (entre 0,5 y 10 μM) y el dinucleótido (ApA o GpA). La concentración de dinucleótido se calculó según los coeficientes de absorción descritos (Osterman y Walz, 1978). Se realizaron siempre los correspondientes controles sin enzima. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, durante distintos tiempos, en el rango de 10-20 h, deteniendo la reacción mediante congelación en aire líquido. La separación de los productos se hizo en un cromatógrafo de HPLC *System Gold* de Beckman, equipado con un detector modelo 166 y una columna Kromasil 100 C18 (5 μm , 0,46 x 15 cm), de fase inversa. La elución se llevó a cabo a temperatura ambiente con un gradiente lineal de 35 min en el que se pasaba, con flujo de 1 ml/min, de tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 7,0, a tampón fosfato de potasio 90 mM, pH 7,0, con 32,5% de metanol. La detección de los picos se llevó a cabo por absorbancia

a 254 nm, cuantificándolos con el programa *Beckman System Gold*. El área de los picos se relacionó con la cantidad de los diferentes productos, mediante calibración con compuestos estándares comerciales. La constante de Michaelis (K_M) y la velocidad máxima (v_{max}) se calcularon según el modelo de Michaelis-Menten, ajustando mediante regresión lineal de una gráfica de dobles inversas, según el procedimiento de Lineweaver-Burk.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A - Detección y caracterización de nuevas ribotoxinas

Una de las principales cuestiones que quedan sin resolver, respecto a las ribotoxinas fúngicas representadas por la α -sarcina, es la de dilucidar cuál es su función biológica. Es decir, ¿para qué producen los microorganismos este tipo de proteínas? Con el fin de contribuir a la resolución de esta pregunta, se decidió abordar un estudio sistemático acerca de su distribución en el reino de los hongos. En este sentido, aunque las primeras ribotoxinas, α -sarcina, mitogilina y restrictocina, fueron descubiertas en los años sesenta, hasta 1990 no se había descrito ninguna otra. En estos últimos años, sin embargo, se ha avanzado de forma muy significativa en este sentido, gracias tanto al trabajo que se presenta a continuación, como al anteriormente realizado por nuestro grupo de investigación (Wirth et al., 1997) y por otros (Arruda et al., 1990; Lin et al., 1995 y 1997; Parente et al., 1996; Huang et al., 1997). Como se demuestra a continuación, se puede decir que las ribotoxinas son un grupo de proteínas extendido entre los hongos filamentosos y, por tanto, no parece que sean simplemente una rareza evolutiva como se creía anteriormente.

El interés de este trabajo de descubrimiento de nuevos genes hay que enmarcarlo, además, dentro de la consideración de que estas proteínas sean un ejemplo de ingeniería natural de proteínas (Kao y Davies, 1995 y 1999). Según esta hipótesis, a partir de una ribonucleasa ciclante no específica, como pueden ser la RNasa T1 o la U2, se habrían ido adquiriendo elementos añadidos de estructura que les permitirían aumentar su especificidad hasta dirigirse específicamente a la inactivación del ribosoma e, incluso, translocarse a través de algunas membranas celulares. Sería precisamente la adquisición de estas nuevas funciones biológicas lo que habría dirigido la evolución de estos genes.

Con este propósito se estudiaron toda una serie de distintas cepas del género *Aspergillus*, y de otros relacionados con él (*Penicillium*, *Neosartorya*, *Hemicarpenales*), con respecto a su capacidad de producción de ribotoxinas. Estas cepas estaban conservadas en el *Department of Microbiology and Immunology* de la *University of British Columbia* por los Drs. Julian Davies y/o Barbara Dill. El resumen de los resultados obtenidos, explicados a continuación, se muestra en la tabla 12

Tabla 12: Resultados de la detección de ribotoxinas en diferentes cepas de hongos filamentosos. Los números de las cepas son los mismos que en la tabla 8.

Cepa		Southern	PCR	Actividad	Inmuno- ensayo
1. <i>Aspergillus giganteus</i>	MDH 18894	+	+	+	nd
2. <i>Aspergillus giganteus</i>	NRRL 10	+	+	+	+
3. <i>Aspergillus giganteus</i>	NRRL 1780	+	+	nd	+
4. <i>Aspergillus giganteus</i>	NRRL 4763	+	+	nd	+
5. <i>Aspergillus viridimutans</i>		+	+	(1)	nd
6. <i>Aspergillus fumigatus</i>		+	+	+	nd
7. <i>Aspergillus sp.</i>		+	+	nd	nd
8. <i>Aspergillus sp.</i>		+	+	nd	nd
9. <i>Aspergillus fischeri</i>		+	+	nd	+
10. <i>Aspergillus restrictus</i>	MDH 13462L	nd	+	nd	nd
11. <i>Aspergillus glaucus</i>		+	+	nd	+
12. <i>Neosartorya glabra</i>		+	+	nd	+
13. <i>Aspergillus nidulans</i>	(CS2008)	-	-	nd	(2)
14. <i>Aspergillus flavus</i>		-	-	nd	nd
15. <i>Aspergillus oryzae</i>	NRRL 447	-	-	nd	nd
16. <i>Aspergillus niger</i>		-	-	nd	nd
17. <i>Aspergillus alutaceus</i>	NRRL 398	-	-	-	nd
18. <i>Aspergillus terreus</i>		-	-	nd	nd
19. <i>Hemicarpenites acanthosporus</i>		-	-	nd	nd
20. <i>Penicillium notatum</i>		-	nd	-	nd
21. <i>Penicillium italicum</i>		-	nd	nd	nd

nd; no determinado, +; detectado, -; no detectado.

(1) presencia de ribonucleasas no-específicas

(2) bandas de alta masa molecular

En primer lugar, se aisló el DNA genómico de todas estas cepas y se hibridó, mediante transferencia de tipo Southern, con el gen codificante para la α -sarcina madura (sin el intrón) marcado radiativamente. Este experimento reveló la presencia de un solo gen, que podría ser el de una ribotoxina, en 11 de las 20 cepas analizadas (figura 19). Algunas de ellas, que ya se sabía que lo expresaban, como la cepa MDH 18894, la productora de α -sarcina, o la NRRL 10, productora de gigantina, se usaron como controles positivos.

Para confirmar la presencia de estos genes de ribotoxina, se diseñaron dos oligonucleótidos, correspondientes a zonas altamente conservadas en la secuencia de las ribotoxinas conocidas hasta entonces. Con estos dos oligonucleótidos se amplificaría, en los genes hasta entonces conocidos, un fragmento de 273 pb, que comprende los aminoácidos 38 a 128 en el caso de la α -sarcina (figura 14). La amplificación mediante PCR se llevó a cabo bajando en sucesivos ciclos la temperatura de hibridación (estrategia *touchdown*; Don et al., 1991; Roux y Hecker, 1997), para aumentar la

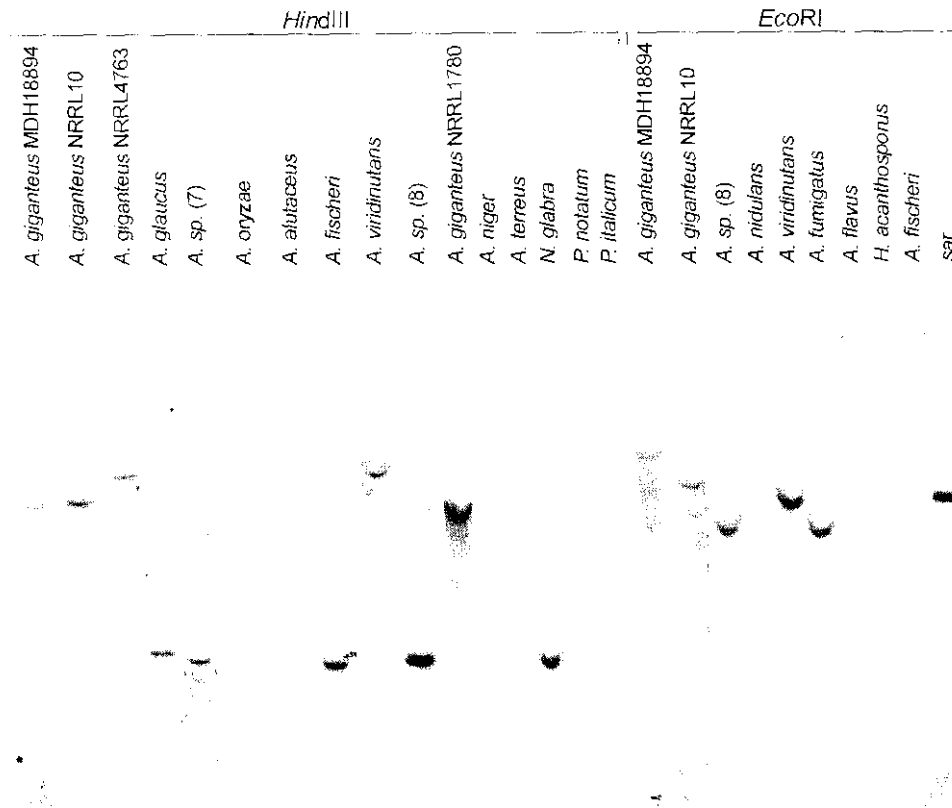
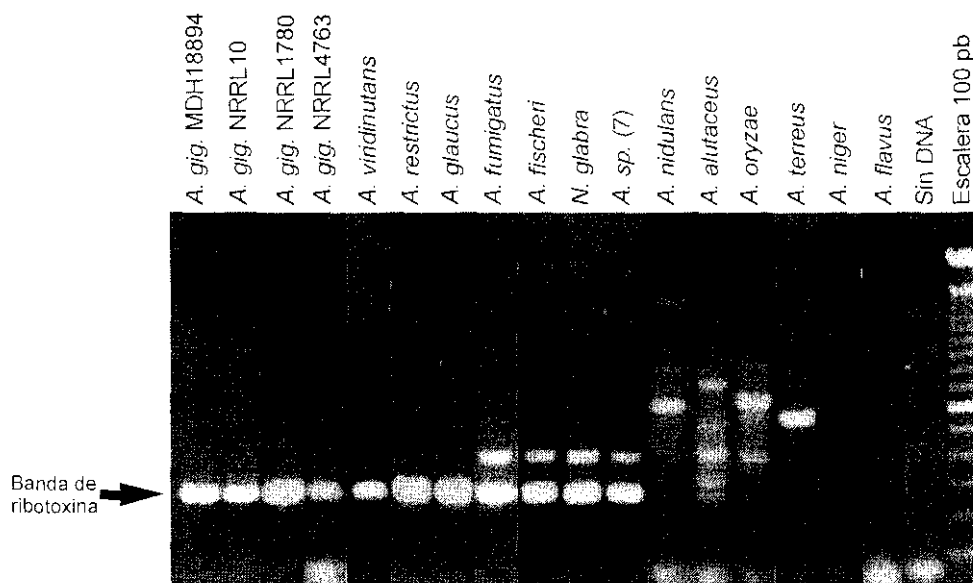


Figura 19: Transferencia de tipo Southern de los DNA fúngicos digeridos con las enzimas indicadas, usando como sonda la secuencia que codifica la α -sarcina madura marcada con ^{32}P . En el caso de las especies no identificadas de *Aspergillus*, el número entre paréntesis es el mismo de las tablas 8 y 12. En el carril «sar» se cargó el plásmido conteniendo la sonda.

probabilidad de que los oligos empleados hibridasen con las zonas deseadas, aunque la coincidencia de secuencias no fuese absoluta. Los resultados obtenidos (figura 20) fueron coherentes con los experimentos de hibridación, detectándose una banda de tamaño similar a la del fragmento del gen *sar* en las mismas cepas en que se había detectado por hibridación. Las cepas cuyo DNA no reaccionaba a la hibridación daban bandas distintas, inespecíficas, tras la PCR.

Además de ensayar la presencia del gen, también se quiso probar la producción de las ribotoxinas por parte de las distintas cepas, no sólo para confirmar los resultados, sino para estudiar si el gen correspondiente se expresaba en condiciones similares a las del gen *sar*. El ensayo más fácil era la inmunodetección de las ribotoxinas producidas en el medio líquido en que se detectó originariamente la α -sarcina (Olson y Goerner, 1965). Se hicieron estos cultivos líquidos, por duplicado, utilizando 6 cepas en las cuales ya se



había detectado el gen, además de la cepa de *A. nidulans* como control **Figura 20**: Análisis de las PCR de detección de ribotoxinas. La banda correspondiente a la secuencia de las ribotoxinas está marcada con una flecha. *A. gig.* es *A. giganteus*.

negativo. Con alícuotas del medio extracelular recogido al cabo de 70 horas de cultivo (tras dos preinóculos de 24 horas) se llevó a cabo una inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos policlonales frente a la α -sarcina (figura 21). Se detectó una banda similar a la α -sarcina en las 6 cepas en que se había detectado el gen. También se detectó una banda inmunorreactiva de menor masa molecular en el cultivo de *A. giganteus* NRRL 4673, que se podría explicar por la hidrólisis parcial de la proteína. Quizá más curiosa es la presencia de una banda débilmente inmunorreactiva de mayor masa molecular en el cultivo de *A. nidulans*. Dado que en esta cepa no se había detectado el gen de ribotoxina, esto se podría deber a otra proteína extracelular que comparta algún determinante antigénico con la α -sarcina. De hecho, en otro estudio similar llevado a cabo por el grupo de Alan Lin en Taiwan (Lin et al., 1995), los cultivos de dos cepas de *Aspergillus* (*A. asperescens* CCRC32117 y *A. flavus* CCRC32140) daban también una ligera inmunorreactividad frente al suero anti- α -sarcina, aunque no se detectaba la presencia del gen en dichas cepas.

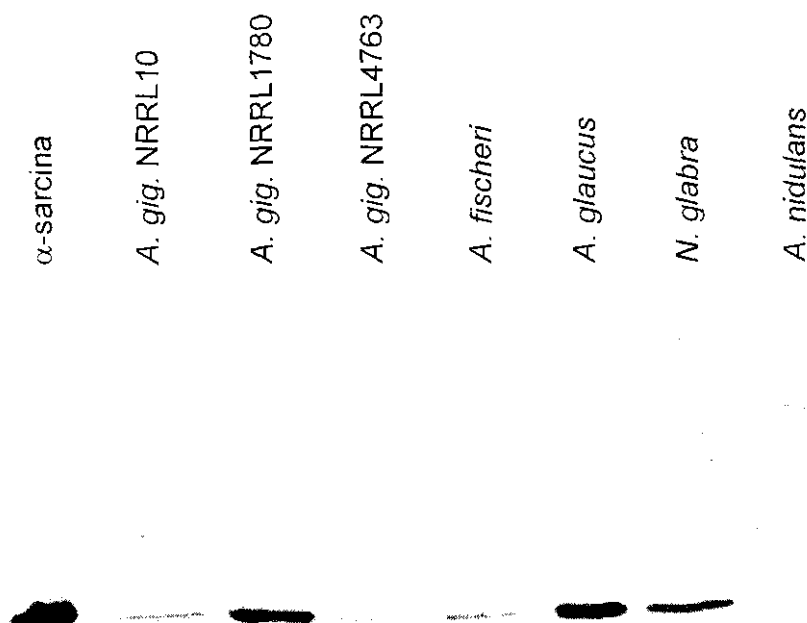


Figura 21: Inmunodetección de ribotoxinas en medios extracelulares de cultivos de las cepas indicadas. Se han utilizado anticuerpos obtenidos frente a la α -sarcina. *A. gig.* es *A. giganteus*.

Finalmente, los resultados se contrastaron mediante un ensayo de actividad específica de ribotoxinas, consistente en hacer reaccionar con reticulocitos una suspensión que contiene mayoritariamente esporas de los hongos. Posteriormente, se extrae el RNA y se comprueba la presencia del fragmento α , producto de la hidrólisis específica del RNA 28S por las ribotoxinas. La producción de restrictocina se ha asociado a la formación de conidióforos (Brandhorst y Kenealy, 1992; Yang y Kenealy, 1992b); por eso, al recoger las esporas en una suspensión, era muy posible que se pudiera detectar la actividad de las ribotoxinas. Se analizaron las suspensiones de esporas de 6 cepas, tanto de aquellas en las que se había detectado el gen como de las que no (figura 22). En las cepas en las que no se había detectado el gen (*P. notatum*, *A. alutaceus*) tampoco se observó el fragmento α . En el resto, se detectó claramente el fragmento en cuatro de ellas (*A. giganteus* MDH18894, *A. giganteus* NRRL10, *A. fumigatus*), aunque también se observaba algo de degradación inespecífica. En el caso de *A. viridinutans*, lo único que se observaba es la degradación inespecífica, por lo que no se pudo observar si se

producía el fragmento α . Esta degradación inespecífica se podría explicar de varias formas. Por una parte, ya se sabe que las propias ribotoxinas, que en concentraciones pequeñas son altamente específicas, son capaces de hidrolizar extensivamente el RNA cuando están en mayores concentraciones (Endo et al., 1983). Por otra parte, también hay que considerar que se manejaron suspensiones de cultivos, enriquecidas en esporas, en las que podría haber otras RNasas no específicas. De hecho, para *A. clavatus*, hongo cercano filogenéticamente a *A. viridinutans* y del cual se han descrito cepas productoras de clavina y c-sarcina (Parente et al., 1996; Huang et al., 1997), también se ha descrito la producción de otra ribonucleasa extracelular, específica de guanina y de la subfamilia de la T1, la RNasa C2 (Bezborodova et al., 1983). Por tanto, la mayor degradación que se observa en el caso de *A. viridinutans* se puede deber a la presencia de otra RNasa extracelular menos específica que la correspondiente ribotoxina, pero más activa.

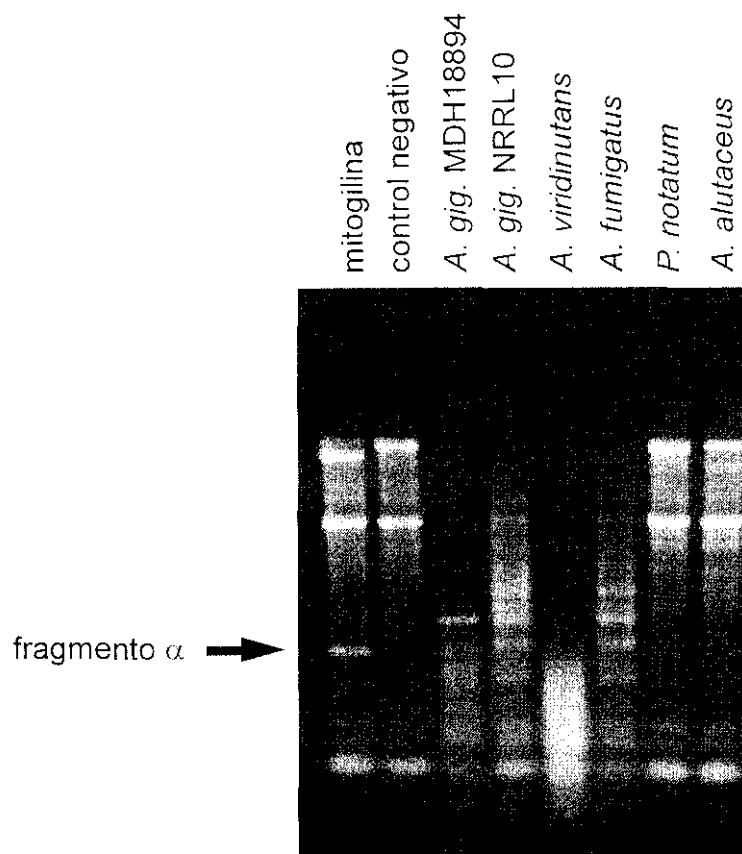
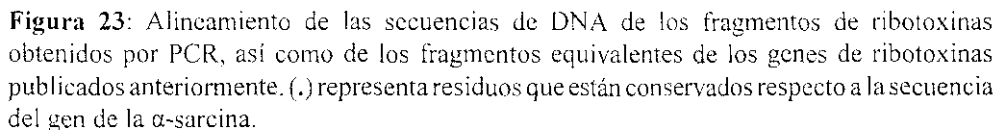


Figura 22: Ensayo de actividad de esporas de las cepas indicadas. La flecha señala la banda correspondiente al fragmento α liberado específicamente por las ribotoxinas. *A. gig.* es *A. giganteus*.

Este último ensayo tiene el valor añadido de ser la primera vez que se demuestra que es posible detectar la presencia de ribotoxinas mediante el empleo de esporas. Se trata, pues, de un método válido, sencillo y reproducible de detección de la presencia de ribotoxinas en hongos filamentosos, aunque presenta el inconveniente de la posible degradación inespecífica de los rRNA.

El siguiente paso, de cara a analizar los genes detectados, fue el de secuenciar los fragmentos obtenidos por PCR. Se hicieron reacciones de secuencia con los fragmentos purificados y los oligos usados para la amplificación. Todos los fragmentos obtenidos resultaron ser de la misma longitud, y sin ningún intrón, lo que está de acuerdo con los fragmentos similares de los genes que ya se conocían (figuras 23 y 24). La mayor diferencia observada fue de un 18%, lo que muestra también la poca variabilidad presente entre los distintos genes de la familia.

Finalmente, estas secuencias se utilizaron para realizar un análisis filogenético de todos los fragmentos similares conocidos (figura 25). Según este análisis, se pueden establecer tres grupos dentro de la familia de ribotoxinas. En uno de ellos estarían la restrictocina, la mitogilina y AspFI, junto con algunas ribotoxinas nuevas, de *A. fischeri*, *A. glaucus* y *Neosartorya glabra* (que son idénticas o muy parecidas a la mitogilina). Un segundo grupo sería el de las ribotoxinas de *A. clavatus*, clavina y c-sarcina, así como la de *A. viridinutans*. El tercer grupo sería el de las ribotoxinas producidas por distintas cepas de *A. giganteus*, siendo la α -sarcina y la gigantina las más características de este grupo. Uno de los resultados más llamativos de este análisis es que las seis secuencias de ribotoxinas del género *Penicillium* obtenidas por el grupo de Alan Lin (Lin et al., 1997) estarían dentro de este último grupo, lo que sugiere que estos hongos del género *Penicillium* estarían más cercanos a algunos del género *Aspergillus* que los miembros de este género entre sí, o al menos los genes de sus ribotoxinas.



	*	20	*	40	*	60	*
α -sarcina	GSSYPHWF	TNGYDGDGKLPKGRTP	IKFGKSDCDRPPKHSKDGNGKTDHVLLEFF	TFPPDGHDKFDSKKPKENPGPA			
3. A. giganteus
gigantina	E..IL.	N.....	D.....
2. A. giganteus	E..IL.	N.....	D.....
4. A. giganteus	IL.....	S.....	V.....	D.....
P. digitatum	E..I.....	V.....	S.....	D.....
P. aculeatum	IL.....	A.....	V.....	S.....	D.....
P. resedanum	E..IL.	G.....	S.....	D.....
P. daleae	S.....	D.....
P. spinolosum	E.....	S.....	D.....
P. chermesinum	S.....	D.....
C-sarcina	IL.....	L.N.....	NVD..N.....	Q.N.....	D.....
clavina	IL.....	W.N.....	N.D..N.....	Q.N.....	D.....
5. A. viridinitans	IL.....	W.N.....	N.D..N.....	Q.N.....	D.....
9. A. fischeri	N..I.....	A.....	QN.M..D.....	D.....
10. A. restrictus	N..I.....	A.....	QN.M..D.....	D.....
21. P. italicum	N..I.....	A.....	QN.M..D.....	D.....
restrictocina	N..I.....	A.....	QN.M..D.....	D.....
12. N. glabra	N..I.....	A.....	QN.M..D.....	D.....
mitogilina	N..I.....	A.....	QN.M..D.....	D.....
6. A. fumigatus	N..I.....	A.....	QN.M..D.....	D.....
7. A. sp.	N..I.....	A.....	QN.M..D.....	D.....
8. A. sp.	N..I.....	A.....	QN.M..D.....	D.....
11. A. glaucus	N..I.....	A.....	QN.M..D.....	D.....

Figura 24: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuencias genómicas obtenidas, así como de los fragmentos equivalentes de las secuencias de ribotoxinas publicadas anteriormente. (.) representa residuos que están conservados respecto a la secuencia de la α -sarcina.

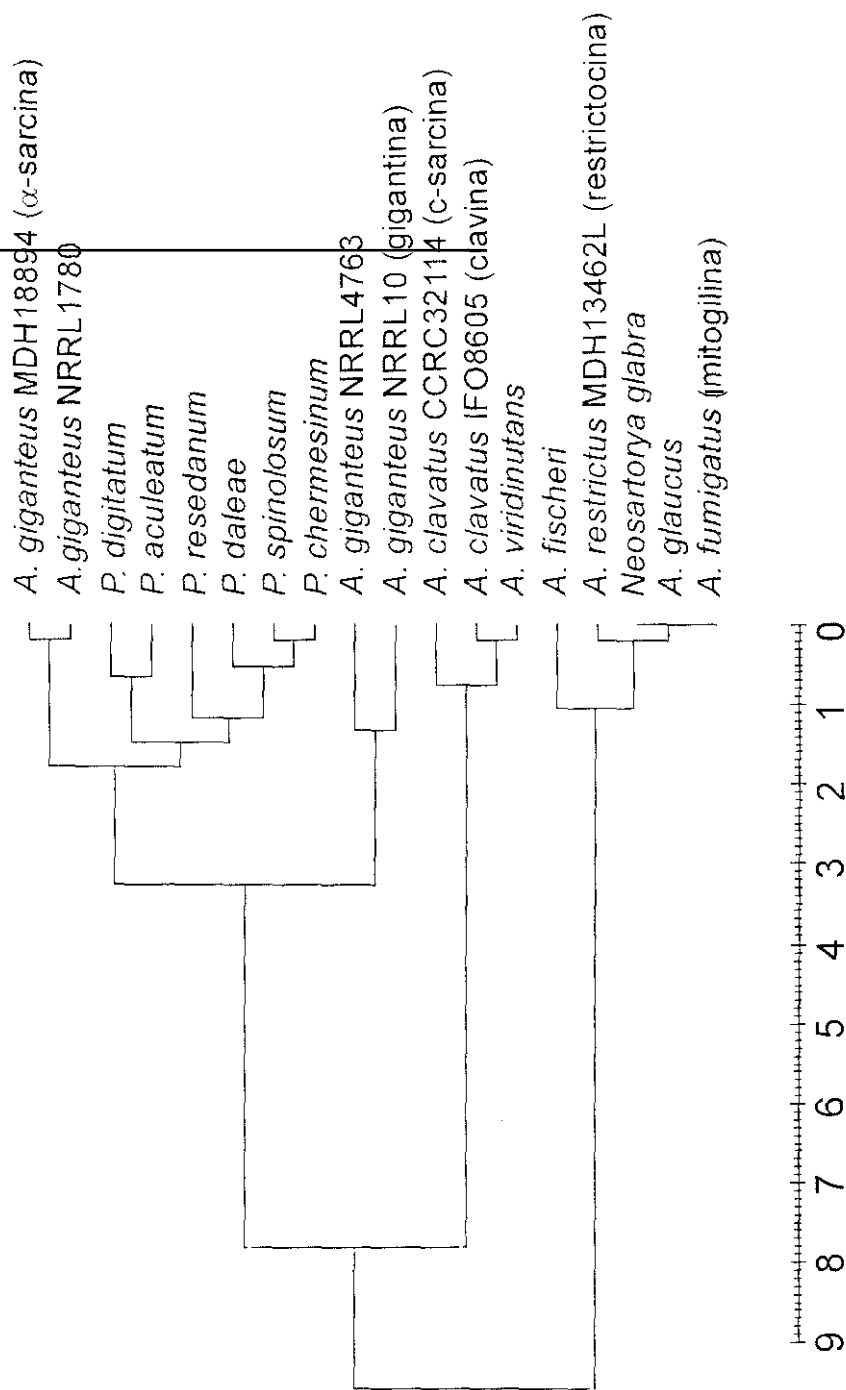


Figura 25: Árbol filogenético construido con las secuencias de nucleótidos de la figura 23. La escala es en porcentaje de distancias de Jukes y Cantor.

La hirsutelina A, ¿un intermedio evolutivo?

La hipótesis de que estas ribotoxinas sean un producto de ingeniería natural (Kao y Davies, 1995) es bastante sugerente y, a la vista de los datos que se van conociendo acerca de esta familia, parece ir confirmándose. Sin embargo, si estamos viendo realmente los productos finales de dicha evolución, y si, efectivamente, estos genes han evolucionado a partir de un gen primitivo correspondiente a una RNasa de la superfamilia de las ribonucleasas microbianas extracelulares (quizá de una RNasa específica de guanina o de purinas), sería lógico pensar que debe haber intermedios evolutivos que hayan ido adquiriendo sólo algunas de las regiones extra que les han proporcionado las actividades añadidas que presentan las RNasas.

Un estudio evolutivo similar se encuentra bastante más avanzado en el caso de las RNasas de mamíferos de la superfamilia de la RNasa A, donde se han establecido dos grandes familias de genes, la de la RNasa A y la de la RNasa seminal bovina (Benner et al., 1997). Esta última familia de proteínas presenta funciones biológicas añadidas (al igual que las ribotoxinas; D'Alessio et al., 1991), y el análisis de la evolución entre las dos familias (que incluye la presencia de mutaciones que no se manifiestan funcionalmente de modo inmediato, puesto que hay genes duplicados que no se expresan) ha permitido identificar, por ingeniería de proteínas, los determinantes de la secuencia que son responsables de la diferencia estructural y funcional entre las dos familias (Ciglic et al., 1998; Opitz et al., 1998).

Uno de estos posibles intermedios se encontró al analizar la secuencia de la hirsutelina A (HtA), una proteína extracelular producida por el hongo entomopatógeno *Hirsutella thompsonii*. De acuerdo con los trabajos publicados, se trataría de una proteína con propiedades biológicas similares a las de las ribotoxinas (Vey et al., 1993; Liu et al., 1996). En concreto, estaba descrita su actividad citotóxica, su capacidad para inhibir la biosíntesis de proteínas, y su actividad ribonucleolítica específica que producía un fragmento de unos 500 pb al ensayarla frente a ribosomas eucariotas (Liu et al., 1996). El cDNA que codifica para esta proteína se había clonado y secuenciado, pero los autores de ese trabajo, aun conociendo estas homologías funcionales con las ribotoxinas, no dedujeron ninguna homología de secuencia con ninguna otra proteína, incluyendo a las ribotoxinas u otras RNasas microbianas extracelulares.

Se alineó la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia descrita del cDNA de la HtA con las de las ribotoxinas más representativas (α -sarcina,

gigantina, clavina y restrictocina), así como con otras RNasas microbianas, la T1 y la U2, y si se encontró una homología muy significativa entre la HtA y las otras RNasas (figura F015). De hecho, la HtA presenta más del 25% de identidad de secuencia al compararla con las ribotoxinas. Además, los residuos catalíticos de toda la superfamilia están alineados en la HtA, en la que corresponderían a His42, Glu66, His113. También se alinean las cuatro cisteínas supuestamente implicadas en los dos puentes disulfuro (Boucias et al., 1998) con las de las ribotoxinas, y las cinco hebras de la potencial lámina β principal, presente en todas las proteínas de la superfamilia.

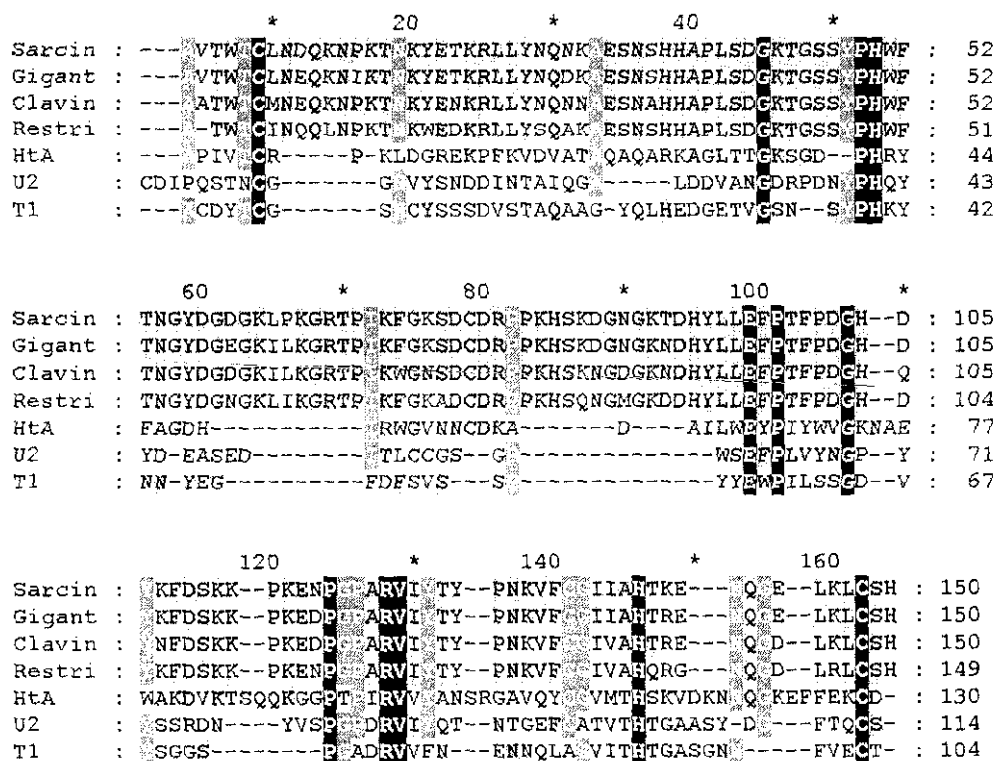


Figura F015: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de ribotoxinas representativas (α -sarcina, gigantina, clavina y restrictocina), hirsutelina A (HtA) y las RNasas no citotóxicas U2 y T1. Los recuadros grises y negros indican los residuos conservados en al menos cuatro o las siete secuencias, respectivamente.

Sin embargo, si se considera la secuencia completa, las diferencias frente a las de las ribotoxinas son grandes en comparación con las existentes entre éstas. Estas diferencias se encuentran en los lazos añadidos a la estructura general de las RNasas microbianas extracelulares, en los que la HtA presenta también diferencias con las RNasas inespecíficas. Por tanto, quizá nos

encontremos ante un intermedio en la evolución de estas proteínas, aunque también podría tratarse de una proteína que ha adquirido similares funciones, pero por evolución independiente.

Por último, hay que añadir que se ha encontrado una proteína, también con las funciones de una ribotoxina, en otro hongo entomopatógeno, *Metarhizium anisopliae*, aunque se desconocen más detalles sobre ella (Raymond StLeger, comunicación personal), por lo que no se puede precisar todavía si sería también un intermedio evolutivo o quizá una proteína más cercana a las ribotoxinas.

B - Mecanismo de producción y secreción

Clonación y producción de α -sarcina en *Pichia pastoris*

Una de las cuestiones más intrigantes que permanecen sin resolver es aquella de cómo se protegen los hongos filamentosos frente a la acción de las propias ribotoxinas que producen. Hay que recordar que la secuencia conservada del lazo sarcina/ricina (SRL), está presente en todos los ribosomas conocidos, incluidos los de distintos *Aspergilli*, y se ha demostrado que éstos son sensibles a la acción de las ribotoxinas (Miller y Bodley, 1988). Hasta el momento de la realización de este trabajo, se habían planteado tres hipótesis. Por un lado, se postulaba que los hongos producían unos precursores ribonucleolíticamente inactivos y que, tras la proteólisis, sólo la forma final madura sería activa; a esta conclusión se había llegado tras la clonación del gen y su expresión heteróloga en distintos hongos (Lamy y Davies, 1991; Lamy et al., 1992; Kao y Davies, 1995). Alternativamente, los mismos autores proponían que se coprodujese un inhibidor específico, de forma similar a como sucede con la producción de la colicina E3 (Boon, 1972; Bowman et al., 1971) o de la barnasa y su inhibidor, *barstar* (Hartley, 1989 y 1997) y como también ocurre con la familia de las RNasas de mamíferos (revisado en Hofsteenge, 1997). Por otra parte, y tras la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* de distintos mutantes de restrictocina en los que se modificaba su péptido señal, se apuntó que el paso determinante podía consistir en la óptima compartimentación celular (Yang y Kenealy, 1992a); estos autores, sin embargo, no fueron capaces de producir proteína activa en *S. cerevisiae*. Tampoco se había conseguido purificar hasta la fecha ninguna de las formas precursoras para poder descartar alguna de estas hipótesis.

Cuando en nuestro grupo se abordó la producción de α -sarcina en *E. coli*, inicialmente se intentó con el cDNA original completo, incluyendo su péptido líder. Sin embargo, no fue posible la expresión de este gen hasta que no se modificó dicho péptido por el de la proteína bacteriana OmpA (Lacadena et al., 1994), lo que está de acuerdo con los distintos requisitos que conforman los péptidos señal eucariotas y procariotas (Von Heijne y Abrahamsén, 1989). Pero lo más destacado era que la imposibilidad de producir la proteína se correspondía con la muerte de las bacterias cuando se inducía el promotor que regulaba el gen, lo que sugería que la ribotoxina sin procesar sería activa, ya que se estaría produciendo pero, al no reconocerse el péptido señal, no se secretaría y permanecería en el citoplasma, actuando sobre los ribosomas. A una conclusión similar habían llegado Yang y Kenealy (1992a) tras la clonación del gen de restrictocina en *S. cerevisiae*. Para confirmar alguna de

estas hipótesis, y para poder disponer de un sistema alternativo de producción, más parecido al original, se planteó la clonación y expresión del gen de la α -sarcina en un sistema eucariota. Ya se habían descrito varios intentos de producción de ribotoxinas, tanto en hongos *Aspergilli* (Lamy y Davies, 1991; Wnendt et al., 1993; Brandhorst et al., 1994) como en *S. cerevisiae* (Yang y Kenealy, 1992a), pero con muy escaso éxito. Por eso, se decidió abordar la producción heteróloga de α -sarcina en la levadura metilotrófica *P. pastoris*.

Para conseguir la producción en *P. pastoris*, se amplificó mediante PCR la secuencia codificante de la α -sarcina, sin intrón y con su péptido líder, a partir del plásmido pOMPA α S (Lacadena et al., 1994). Primeramente se hicieron dos construcciones, denominadas pHILD2pre α S y pHILS1pre α S, que se detallan en el esquema (figura 25). La primera de ellas, pHILD2pre α S, incluía el cDNA codificante para la α -sarcina entera, con su péptido líder original (prepro- α -sarcina) y su codón de iniciación, colocado bajo el control del promotor del gen *AOX1* de *P. pastoris*. En la segunda de ellas, pHILS1pre α S, la secuencia señal de la fosfatasa ácida de la levadura estaba fusionada a la secuencia codificante de esta prepro- α -sarcina. Esta segunda construcción se hizo con la pretensión de que se produjera en el medio extracelular el precursor completo de la proteína, para así poder purificarlo y caracterizarlo, ya que se ha descrito que las levaduras generalmente inician la traducción en el codón ATG más cercano al extremo 5' del mRNA. Sin embargo, esto no fue así, como se explica más adelante.

Los dos vectores descritos, pHILD2pre α S y pHILS1pre α S, se lincalizaron con *NotI* y *BglII*, respectivamente, para obtener fragmentos cuyos extremos fueran los del gen *AOX1* de la levadura y que incluyeran el gen a expresar y el gen marcador, *HIS4*. De esta forma, al transformar la cepa GS115, que presenta una mutación en el gen *HIS4* (genotipo *his4*), se favorece la doble recombinación homóloga en la que se sustituiría el gen *AOX1* de la levadura por la construcción insertada en la célula. Se busca favorecer este tipo de integración frente a otras que son siempre posibles (y que en algunos casos también podrían servir para la producción de la proteína), como la integración por recombinación en *HIS4* porque, si se da la sustitución en *AOX1*, se anula la funcionalidad de este gen y cambia el fenotipo de la levadura, que pasa a depender sólo de un segundo gen de alcohol oxidasa, *AOX2*, para su crecimiento en metanol, que se hace mucho más lento. Por eso, se habla de un fenotipo Mut^s (de *methanol utilization - slow*) en vez de Mut^r. Lo que se hizo, pues, tras la transformación y selección de las células transformadas en medio mínimo carente de histidina, fue crecer las colonias obtenidas en placas de medio mínimo con glucosa o metanol como fuentes de carbono. Las levaduras que crecían más lentamente en metanol pero crecían normalmente en glucosa,

eran las que presentaban un fenotipo Mut⁺, debido en principio al reemplazamiento del gen *AOX1*.

El siguiente paso fue ensayar la capacidad de producción de α -sarcina recombinante por parte de las cepas seleccionadas, lo que se hizo creciendo las células en medio con glicerol como única fuente de carbono y transfiriéndolas después a un medio con metanol sustituyendo al glicerol. En este segundo medio apenas crecen (sólo tienen el producto del gen *AOX2* para metabolizar el metanol), pero se induce el promotor que regula la proteína recombinante. La detección de las proteínas producidas se llevó a cabo mediante inmunotransferencia, tras PAGE-SDS, de los medios extracelulares de producción. En todas las cepas de fenotipo (His⁺ Mut⁺) ensayadas, se observaron dos bandas inmunorreactivas. Una de ellas migraba como la α -sarcina fúngica madura y la otra era ligeramente mayor (figura 26), pero no lo suficientemente grande como para que pudiera corresponder a la forma prepro- α -sarcina con su péptido señal completo. La única diferencia observada entre ambas construcciones genéticas fue que las células transformadas con pHILD2pre α S producían más proteína recombinante, ya que las bandas se podían observar también tras tinción de los geles con azul de Coomassie, y no sólo mediante inmunodetección.

Una de estas cepas transformadas con pHILD2pre α S se seleccionó para llevar a cabo una producción a mayor escala de la proteínas. Con un esquema de purificación prácticamente idéntico al utilizado para la proteína fúngica natural, y partiendo del medio extracelular obtenido después de inducir en medio con metanol, se obtuvo una fracción que contenía la mezcla de ambas proteínas inmunorreactivas y ribonucleolíticamente competentes (figura 26). Sin embargo, no fue posible separarlas en cantidad suficiente tras la utilización de distintas alternativas cromatográficas, ni siquiera mediante RP-HPLC. Se optó entonces por caracterizar la mezcla, con el propósito de averiguar a qué se debía la presencia de la proteína de mayor tamaño y así poder eliminarla de las preparaciones.

Aunque la α -sarcina fúngica natural no está glicosilada, no se podía descartar a priori la adición de azúcares como una de las posibilidades para explicar la presencia de la banda inmunorreactiva de mayor tamaño, ya que la ruta de secreción en levaduras está muy relacionada con los mecanismos de glicosilación (Cregg et al., 1993; Kukuruzinska et al., 1987), y éstos no son iguales en los hongos filamentosos y en las levaduras; ni siquiera se conservan entre las distintas levaduras. Sin embargo, finalmente se descartó esta hipótesis, puesto que la secuencia consenso de N-glicosilación no se encuentra en la α -sarcina (Kukuruzinska et al., 1987; Sacco et al., 1983) y, además, ninguna de

las dos proteínas recombinantes reaccionó con la concanavalina A, lo que indicaba que no había tampoco modificación por manosas.

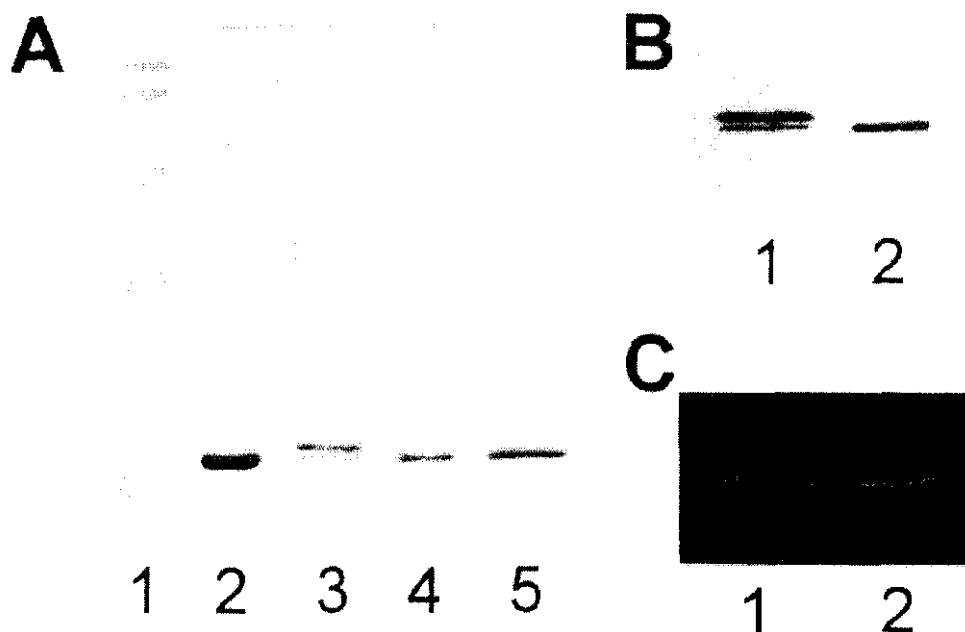


Figura 26: Caracterización de la α -sarcina purificada del cultivo de células de *P. pastoris*. **A:** gel resultante de PAGE-SDS, tinción con azul de Coomassie: 1: patrones de masa molecular preteñidos (Bio-Rad); 2: 1,0 μ g de α -sarcina fúngica; 3: 0,5 μ g de las proteínas aisladas de cepas transformadas con pHILD2pre α S; 4: 0,5 μ g de la proteína aislada de cepas transformadas con pHILD2pre α S(A-2K); 5: 1,0 μ g de la misma proteína. **B:** Inmunodetección con anticuerpos frente a α -sarcina de las muestras 3 y 4 del panel A. **C:** Zimograma frente a poli(A) a pH 7,5 de las muestras 3 y 4 del panel A.

Se pensó entonces que la explicación más plausible debía ser algún defecto en el procesamiento proteolítico postraduccional de la proteína. Por este motivo, se obtuvo la secuencia del extremo amino de la mezcla de las dos proteínas, que reveló la presencia de la proteína madura y de otra forma con seis aminoácidos más en el extremo amino. Estos seis aminoácidos forman parte del péptido pro de la α -sarcina (figura 27). Este procesamiento parcial se podría explicar por la saturación de la proproteína convertasa encargada de llevarlo a cabo. Normalmente, esta enzima sería la homóloga de Kex2p de *S. cerevisiae*, aunque este paso no parecía haber sido un problema en otras sobreproducciones de proteína que necesitaran de un corte similar (Huecas et al., 1999). Otra explicación posible era que tuviese lugar un reconocimiento sólo parcialmente efectivo de la secuencia de corte por dicha endoproteasa análoga a Kex2p. Como se explicará más adelante, Kex2p suele cortar tras un sitio dibásico Lys-Arg (Julius et al., 1984), aunque estos no son los únicos

elementos de reconocimiento para su actuación. Así, todo sugería que la presencia del par Ala-Arg en el extremo carboxilo del péptido pro de la α -sarcina hacía que no fuera bien reconocida por la convertasa de la levadura, aunque sí debe reconocerla la convertasa propia del hongo, como se discute más adelante.

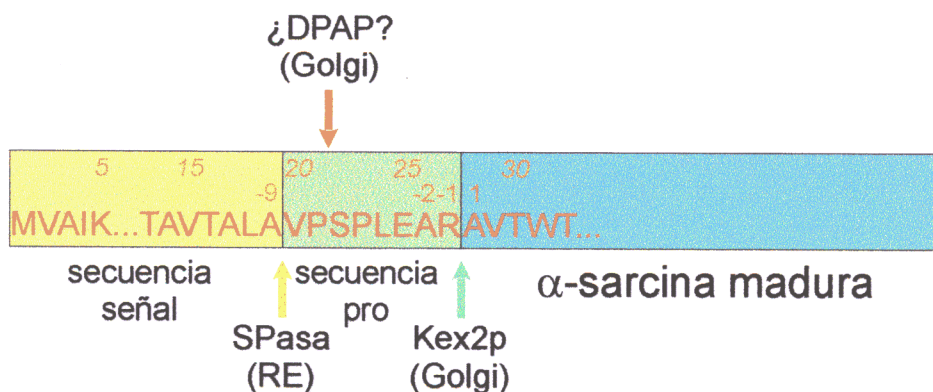


Figura 27: Esquema del procesamiento proteolítico del precursor de la α -sarcina. En cursiva, la numeración de la secuencia del precursor; en letra normal, la numeración de la secuencia según la proteína madura. La secuencia señal sería cortada en el retículo endoplásmico (RE) por la peptidasa señal (SPasa) entre Ala 19 y Val 20, dirigiéndose la proproteína al aparato de Golgi, donde quizá se corte por una dipeptidil aminopeptidasa (DPAP) y, seguro, por una proproteína convertasa, probablemente homóloga a Kex2p.

Para comprobar esta hipótesis, se construyó un tercer vector, denominado pHILD2pre α S(A-2K), en el que se reemplazó la Ala en posición -2 respecto a la secuencia madura de la proteína por una Lys, en el vector pHILD2pre α S, con lo que se establecía el par dibásico Lys-Arg en la secuencia de corte por la proproteína convertasa (figura 27). Al transformar células GS115 con este vector, seleccionar las que presentaran fenotipo Mut^s e inducir su producción, ahora sí que se obtuvo en el medio extracelular exclusivamente la α -sarcina madura (figura 26).

Una de las colonias obtenidas por transformación con este vector se escogió para producir, en medio compuesto (BMGY y BMMY) y a mayor escala, proteína madura recombinante. Se purificó a homogeneidad de acuerdo con su comportamiento en electroforesis y HPLC, y por presentar una sola secuencia del extremo amino, con un rendimiento de aproximadamente 1 mg de proteína pura por litro de cultivo de inducción. Dicha secuencia, además, se correspondía con la descrita para la α -sarcina madura. La proteína así purificada mantenía su integridad estructural con respecto a la α -sarcina nativa, de acuerdo con sus espectros de absorción UV, de dicroísmo circular (figura 28) y su composición de aminoácidos. Asimismo, se ensayó su actividad

ribonucleolítica específica frente a ribosomas (figura 29), en la que se produce el fragmento α tras reacción con reticulocitos de conejo, en la misma medida que con la α -sarcina madura fúngica.

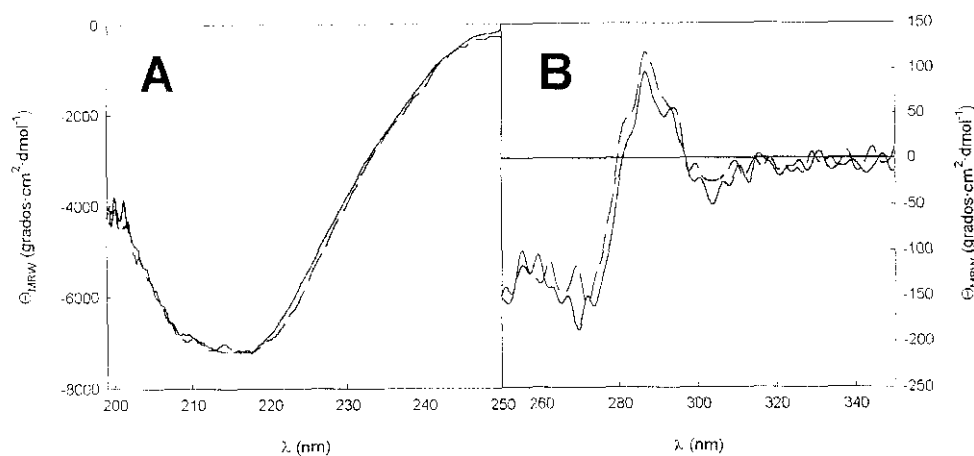


Figura 28: Espectros de CD en el UV lejano (A) y próximo (B) de la α -sarcinase fúngica (línea continua) y obtenida a partir de una cepa de *P. pastoris* transformada con pHIL.D2pre α S(A-2K) (línea discontinua).

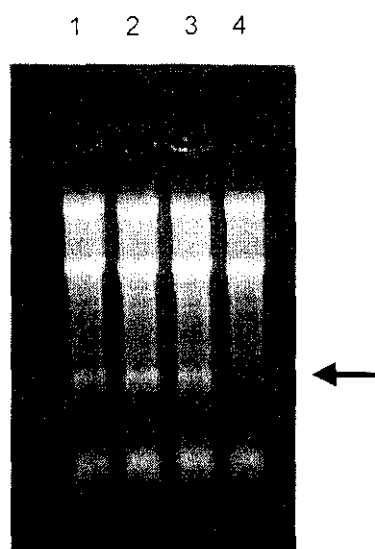


Figura 29: Ensayo de actividad específica de la α -sarcinase purificada de *P. pastoris*. 1: 60 ng de α -sarcinase fúngica; 2: 60 ng de α -sarcinase de una cepa de *P. pastoris* transformada con pHIL.D2pre α S(A-2K); 3: 120 ng de la misma muestra; 4: control negativo de α -sarcinase

Todos estos resultados, además de permitir la sobreproducción de α -sarcinase madura en *P. pastoris*, sirvieron para extraer una serie de

conclusiones acerca de su mecanismo de producción, que se discuten a continuación.

La secuencia señal de *Aspergillus* es reconocida en *Pichia*

A la hora de plantearse la producción y secreción de proteínas heterólogas en un organismo eucariota como *P. pastoris*, es importante tener en cuenta la secuencia señal que se ha de utilizar. Si bien las secuencias señal tienen un patrón común a todos los organismos eucariotas, no todas son intercambiables entre ellos (Von Heijne y Abrahamsén., 1989). De hecho, se han descrito casos de secreción en *P. pastoris* usando la propia secuencia señal de la proteína heteróloga, pero también otros casos en que no se ha conseguido secretar la proteína más que usando alguna secuencia señal ya probada en *Pichia*. Una regla que parecería lógica es aquella según la cual cuanto más relacionados filogenéticamente estén los organismos implicados, más probable será que sea reconocida la secuencia señal, aunque la experiencia dice que, en realidad, no sirve de mucho si no se comprueba para cada caso particular.

En lo que a la situación aquí descrita se refiere, hay que comenzar recalcando cómo el único intento de producción de una ribotoxina en levadura, la restrictocina en *Saccharomyces cerevisiae*, falló precisamente porque no se conseguía la secreción efectiva y cuantitativa de la proteína. Ésta resultaba tóxica para las células productoras, excepto cuando se producían mutantes catalíticamente inactivos (Yang y Kenealy, 1992a).

Por el contrario, del trabajo aquí presentado se desprende que la secuencia señal de la α -sarcina, proveniente de un hongo *Aspergillus*, sí es efectivamente reconocida por la levadura *P. pastoris*. La proteína naciente en el ribosoma debe ser dirigida, por tanto, mediante la ruta de translocación cotraduccional, al retículo endoplásmico para continuar allí la traducción y poder seguir la ruta de secreción. Por eso las células transformadas con los plásmidos pHILD2pre α S y pHILD2pre α S(A-2K) producen α -sarcina extracelular sin problemas de toxicidad. En el caso de las células transformadas con pHILS1pre α S, hay dos secuencias señal fusionadas, por lo que la cuestión no es tan sencilla. En primer lugar, parece obvio que, en contra de lo que se pretendía, la producción de prepro- α -sarcina no tiene lugar, por lo que no se reconoce simplemente la secuencia señal situada en 5', la de la fosfatasa ácida. Por otra parte, también hay que descartar que se reconozca una secuencia señal que sea una «fusión» de las dos secuencias, pues las secuencias señal presentan un patrón bien delimitado de longitud, incompatible con la longitud de la suma de las dos secuencias (Von Heijne, 1985). Si sólo se obtuviera la proteína

madura, no se podría discriminar cuál de las dos secuencias señal es la utilizada, puesto que las proproteína convertasas son capaces de cortar secuencias pro de muy distinta longitud, siempre que presenten una secuencia de corte adecuada. Sin embargo, en este caso, al obtener la forma madura y una forma pro, similar a la que se ha detectado en el caso de la proteína fúngica (Endo et al., 1993a y b), es lógico pensar que la secuencia señal que se utiliza es la propia del hongo, por lo que no se traduciría la secuencia señal de la fosfatasa alcalina. Se han obtenido resultados similares usando el plásmido pHIL-S1 con la secuencia señal de la enzima convertora de angiotensina testicular (ACE_T) fusionada en fase con la secuencia señal de la fosfatasa ácida (Sadhukan et al., 1996). Estos resultados contradicen la hipótesis general aceptada de que la secuencia reconocida es la correspondiente al ATG más cercano al extremo 5' del mRNA. En cuanto al menor rendimiento obtenido con pHILS1pre α S con respecto a PHILD2pre α S, se puede deber a la presencia de la secuencia señal añadida, que hace que el codón de iniciación utilizado, el proveniente de la secuencia fúngica, se encuentre más alejado del promotor.

El procesamiento del precursor de la α -sarcina se da en varios pasos

Aunque ya había trabajos anteriores que estudiaban la producción de la α -sarcina en el hongo *A. giganteus* (Endo et al., 1993 a y b), estos se limitaban a detectar las distintas especies intermedias, sin aislarlas, ni caracterizarlas y, por tanto, sin entrar en el detalle de la posible estructura primaria de los distintos precursores.

El primer paso en el procesamiento se debe dar en la translocación al retículo endoplásmico, donde se produce el corte del péptido señal. Están estudiadas en detalle las características que reúnen los péptidos señal eucariotas (von Heijne, 1985). Estas características se dan en el caso del péptido señal de la α -sarcina que, como ya se ha dicho, es reconocido efectivamente por la levadura *P. pastoris*. El sitio de corte de la peptidasa señal, que delimita de forma precisa la separación entre un péptido señal y la proteína que es translocada al retículo, también está estudiado en detalle (Von Heijne, 1983, 1985 y 1986). Recientemente, se ha desarrollado un programa para analizar tanto la potencialidad de una secuencia como péptido señal de secreción, como su sitio de corte (Nielsen et al., 1997), y que mejora las reglas que ya expuso Von Heijne anteriormente (1986). Aplicando este método al caso de la prepro- α -sarcina, la peptidasa señal debería cortar entre los residuos Ala19 y Val20 del precursor (figura 30). Sin embargo, la secuencia pro que se encontró tras la producción en *Pichia* comienza en el residuo Ser22, lo que sugiere que el corte

se daría entre Pro21 y Ser22, en un enlace «prohibido» según los métodos deductivos expuestos (figura 27).

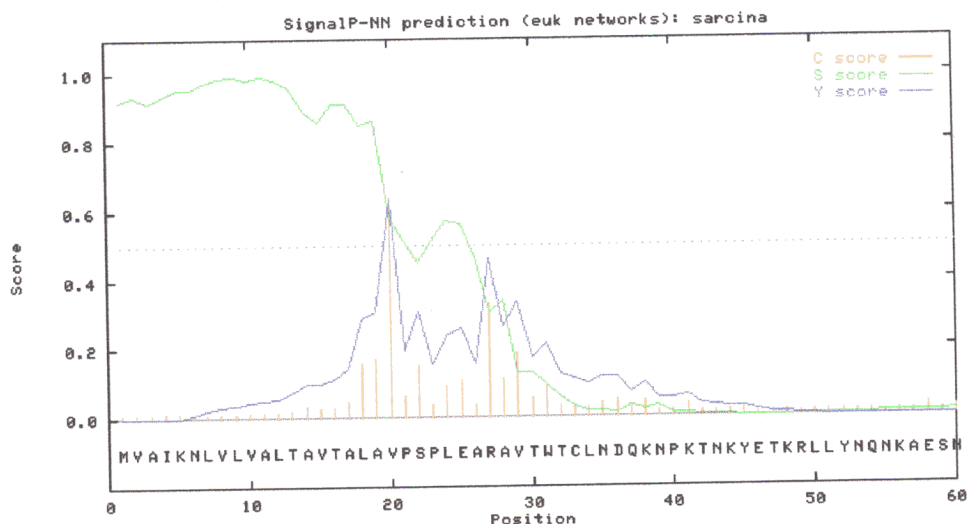


Figura 30: Predicción de la secuencia señal del precursor de α -sarcina. La puntuación C (en rojo) indica la probabilidad de que un residuo sea el del sitio de corte (en posición P-1) por la peptidasa señal. La puntuación S (en verde) indica la probabilidad de que un residuo pertenezca a una secuencia señal. La puntuación Y (en azul) combina las dos anteriores para que sea máxima en aquellos residuos que tengan una alta probabilidad de ser un sitio de corte, y en los que se dé una transición de alta a baja probabilidad de pertenecer a una secuencia señal (Nielsen et al., 1997).

¿Cómo se explica esta divergencia? No se puede descartar que la pareja constituida por la α -sarcina y *P. pastoris* constituya una excepción a la regla, pero parece más probable que a explicación resida en la posibilidad de que haya una dipeptidil aminopeptidasa (DPAP) en la ruta de secreción de *P. pastoris*, que cortaría tras algunos residuos de prolina. De hecho, está descrita la presencia de una dipeptidil aminopeptidasa, la DPAP-A, producto del gen *STE13*, anclada en la membrana del aparato de Golgi de *S. cerevisiae*, e implicada en el procesamiento de proteínas que siguen la ruta de secreción constitutiva (Julius et al., 1983; Jones, 1991). Su descripción se llevó a cabo al estudiar el procesamiento del factor α de apareamiento y observar que se liberaban dipéptidos Glu-Ala y Asp-Ala situados en el extremo amino de los fragmentos proteicos (Julius et al., 1983; Fuller et al., 1988). Esta misma función ha sido descrita también como parte de la ruta de secreción de *P. pastoris*, en la que en muchos casos se utiliza este mismo espaciador, proveniente del precursor del factor α , para producir proteínas heterólogas secretadas en *P. pastoris*, obteniéndose un procesamiento correcto. Sin

embargo, ni el correspondiente gen homólogo de *P. pastoris*, ni su proteína, han sido aislados o caracterizados. Por tanto, en levaduras es bien conocido el procesamiento de los dipéptidos X-Ala en precursores de proteínas secretadas; pero no así los dipéptidos X-Pro, como el que nos ocupa.

Sin embargo, aunque sólo sea una hipótesis el corte de ese dipéptido por una DPAP de *P. pastoris*, es bastante sugerente, puesto que sí que está descrito el papel de dipéptidos X-Pro en el procesamiento de proteínas de secreción (revisado en Kreil, 1990). Por ejemplo, es el caso de los precursores de la melitina (principal constituyente del veneno de abejas; Habermann, 1972; Suchanek 1972; Vlasak et al., 1983) y de algunas cecropinas (producidas por polillas en respuesta a infecciones bacterianas; Boman y Hultmark, 1987; Lidholm et al., 1987; Boman et al., 1989). En estos precursores, entre el péptido señal y el péptido maduro se encuentran varios dipéptidos que son hidrolizados sucesivamente, y que son del tipo Ala-Pro, Glu-Pro, Asp-Pro, Glu-Ala y Asp-Ala. También está descrito en proteínas de otras levaduras, como el propio factor α de *Kluyveromyces lactis* (Egel-Mitani y Hansen, 1987), o una proteasa extracelular de *Yarrowia lipolytica* (Matoba y Ogrydziak, 1989; Fabre et al., 1991). También es conocido el caso de las DPAP de tipo IV de mamíferos, que presentan especificidad por dipéptidos X-Pro, además de X-Ala (McDonald y Schwabe, 1977; Mentlein et al., 1993; Pauly et al., 1996).

En cuanto a los hongos del género *Aspergillus*, se han aislado dos aminopeptidil peptidasas. Una de ellas es del tipo IV, y libera dipéptidos X-Pro- (Beauvais et al., 1997b). La otra formaría un tipo nuevo, por lo que se llamó DPAP V, y corta tras X-Ala-, aunque también tras His-Ser- y Ser-Tyr- (Beauvais et al., 1997a). La mayor peculiaridad de estas dos DPAP es que son extracelulares (a diferencia del resto de DPAP descritas), lo que complica la posibilidad de que participen en el corte de un dipéptido en una secuencia pro que se encuentra en la ruta de secreción, aunque no cabe descartarse del todo, dado que también utilizarían dicha ruta. En cuanto a resultados similares en *Aspergillus*, al producir una proteína de fusión entre la glucoamilasa y la interleukina 6 humana, con un péptido espaciador que proporciona un sitio de corte por Kex2p, el primero de los dos dipéptidos presentes en el extremo amino de la interleukina (Ala-Pro-Val-Pro-) sí es cortado, tanto en *S. cerevisiae* como en *A. nidulans* (Guisez et al., 1991; Contreras et al., 1991). Por tanto, de los resultados de esta Tesis no se puede deducir que el corte por la DPAP, que se da en *P. pastoris*, se dé asimismo en el hongo original, *A. giganteus*, aunque sí se puede sugerir esa posibilidad.

El siguiente paso en el procesamiento sí que estaría claro, y es precisamente el que falló parcialmente en la producción en *Pichia* utilizando

las construcciones pHIL.D2.pre α S y pHIL.S1.pre α S. Se trataría del corte de la secuencia pro (o de parte de ella, si ya ha sido parcialmente cortada) en el aparato de Golgi por parte de una proproteína convertasa. De este paso se habla más en detalle a continuación.

La especificidad de la proproteína convertasa de *Pichia pastoris*

Las modificaciones postraduccionales de las proteínas son una de las formas de que disponen los organismos para generar una mayor diversidad funcional a partir de un limitado repertorio genético. Una de estas modificaciones es la proteólisis limitada, en la que un precursor polipeptídico es cortado para dar péptidos o proteínas más pequeñas, y que pueden ser así activadas o cambiar de función. Este tipo de modificación es especialmente importante en el caso de las proteínas secretadas al medio extracelular, donde se conocen ejemplos desde hace bastante tiempo, como en el caso de las enzimas digestivas pancreáticas, tripsina y quimotripsina (revisado en Neurath, 1989), o de hormonas como las lipotropinas (Chrétien y Lim 1967) o la insulina (Steiner et al., 1967; Chance et al., 1968). De aquí vino la denominación de «proproteína» para el precursor, ya que en el caso de las hormonas era una «prohormona», una molécula precursora de la hormona. En estos primeros precursores, el procesamiento implicaba la ruptura de la proproteína por sitios donde había un par de aminoácidos básicos. Con el tiempo, el concepto del precursor se ha ido extendiendo, al encontrar numerosos ejemplos entre las proteínas que utilizan la ruta de secreción, como pueden ser hormonas, neuropéptidos, receptores, glicoproteínas de virus, toxinas, moléculas de adhesión, proteasas, etc.

Conviene aclarar aquí, antes de continuar con la discusión, la nomenclatura que introdujeron Schechter y Berger (1967) para las proteasas. Según esta convención, los subsitios en que se colocarían los distintos aminoácidos del péptido a hidrolizar se denominan con la letra P (de péptido), y los subsitios en la proteasa, que interaccionan con dichos residuos P, con la letra S (de subsitio). Los residuos situado en el lado amino del enlace a hidrolizar se numeran con cifras positivas, contando hacia el extremo amino del péptido: P₁, P₂, P₃, etc. (es decir, el residuo cuyo grupo carboxilo forma parte del enlace a hidrolizar es el P₁). Los residuos del lado carboxilo del enlace a hidrolizar se numeran igual, contando hacia el extremo carboxilo, pero se señalan como P₁', P₂', P₃', etc. Los subsitios correspondientes a cada residuo se nombran igual, pero con la letra S: S₃, S₂, S₁, S₁', S₂', S₃', etc. (figura 31).

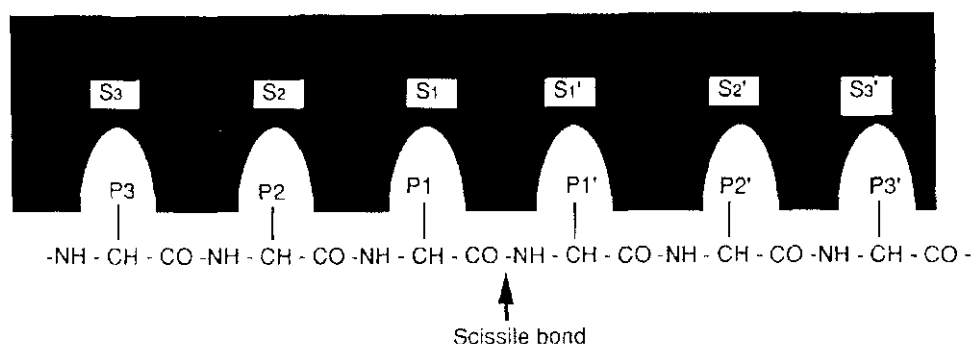
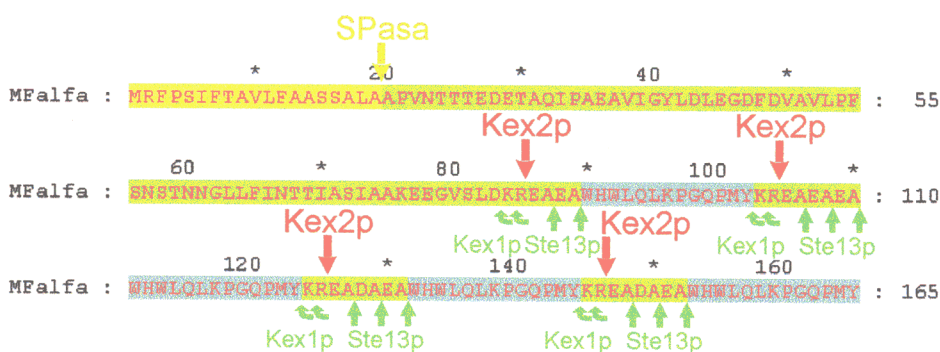


Figura 31: Esquema de la nomenclatura de subsitios en proteasas (tomado de Benyon y Bond, 1989). *Scissile bond*: enlace a hidrolizar.

En 1984 se identificó, dentro del reino de los hongos, en *Saccharomyces cerevisiae*, la primera enzima responsable del corte de este tipo de precursores, producto del gen *KEX2*, del que se ha derivado el nombre «kexina» o Kex2p (EC 3.4.21.61; Julius et al., 1984), al estudiar el procesamiento del factor α de apareamiento. Posteriormente, entre 1989 y 1996, se han descrito hasta siete genes humanos distintos que codifican serinproteasas dependientes de calcio similares a la kexina y a la proteasa bacteriana subtilisina, que se han denominado «proteína convertasas» o «*subtilisin-like proprotein convertases*», y que cortan en el extremo carboxilo de la secuencia consenso (R/K)-X_n-(R/K)-, donde n = 0, 2, 4, ó 6, según la convertasa. Muchas de ellas prefieren un aminoácido básico en P2, lo que se corresponde con la observación inicial sobre los sitios dibásicos (algunas revisiones son Seidah y Chrétien, 1997; Zhou et al., 1999). También se ha descrito otra familia de proteína convertasas, que son aspartilproteasas, entre las cuales se incluye, por ejemplo, una de las proteasas responsables del procesamiento del precursor de la proteína amiloide (Yan et al., 1999; Sinha et al., 1999).

El mutante *kex2* en *S. cerevisiae* fue identificado por la ausencia de expresión de la «toxina asesina» (*killer toxin*) madura, pero también se asoció a la esterilidad o falta de apareamiento, debido a que no se producían feromonas α maduras (Leibowitz y Wickner, 1976; Wickner y Leibowitz, 1976). También se asoció con el fallo en uno de los pasos necesarios en la ruta de procesamiento de proteínas secretadas, que aparecían con mayor tamaño en el medio extracelular (Rogers et al., 1979). Finalmente, el trabajo del grupo de Jeremy Thorner permitió su identificación como la endoproteasa necesaria al menos para el procesamiento del factor α de apareamiento (Julius et al., 1984). Éste es un tridecapéptido que secreta uno de los tipos de células haploides de

S. cerevisiae (*MATa*), y que tiene función feromónica, al ser necesario para el apareamiento con el tipo celular *MATa*. Se descubrió que la célula produce un gran precursor, que incluye cuatro copias del péptido, en donde además de un péptido señal y una secuencia pro en el extremo amino, las cuatro copias están separadas por unos «espaciadores». El procesamiento necesariamente tenía que incluir el corte por una endopeptidasa para rendir cuatro fragmentos, que después tendrían que ser «pulidos» para dejar exclusivamente los péptidos maduros (figura 32; Kurjan y Herskowitz, 1982). Poco a poco se fueron identificando las proteasas responsables del procesamiento del factor α : primero fue la dipeptidil aminopeptidasa, producto del gen *STE13* (llamado así precisamente por fallar el apareamiento y ser «estéril»; Julius et al., 1983); después la endoproteasa, del gen *KEX2* (Julius et al., 1984) y, finalmente, una carboxipeptidasa, producto del gen *KEX1*, que elimina los residuos básicos que quedan en el extremo carboxilo de los péptidos tras el corte por Kex2p (Wagner y Wolf, 1987).



Factor α maduro (4 copias)

Figura 32: Esquema de los pasos del procesamiento del precursor I del factor α de apareamiento. Sobre la secuencia de aminoácidos (Kurjan y Herskowitz, 1982) se indican los cuatro péptidos maduros (en azul), la secuencia señal (en amarillo) y los trozos que se procesan en el aparato de Golgi (en verde). Se indican también los sitios de corte de las distintas proteasas.

La función de Kex2p como convertasa de distintos precursores secretados se confirmó rápidamente, primero al estudiar el procesamiento de la toxina asesina (Bostian et al., 1984), y después otras proteínas propias de *S. cerevisiae*, pero también se vio su papel en el procesamiento de proteínas heterólogas producidas en la levadura (Bitter et al., 1984; Brake et al., 1984), incluida una glucoamilasa de *Aspergillus* (Innis et al., 1985), o en proteínas humanas aisladas (Bathurst et al., 1987) o producidas en células humanas que expresan Kex2p (Thomas et al., 1988), lo que, unido a la secuenciación del gen

KEX2 (Fuller et al., 1988; Mizuno et al., 1988) abrió el camino para el descubrimiento de las convertasas homólogas en la especie humana.

En cuanto a la especificidad de Kex2p, desde el principio se apuntó al sitio dibásico Lys-Arg- o Arg-Arg- como requerimiento del sitio de corte (Julius et al., 1984), sin duda con la influencia de los numerosos sitios de corte dibásicos que se iban encontrando en proteínas de mamíferos, y todavía hoy se simplifica diciendo que Kex2p es una convertasa que corta en sitios dibásicos. En esta línea parecen apuntar los experimentos en *P. pastoris* descritos en esta Tesis, puesto que al introducir la Lys en P2 se obtuvo un corte eficaz por la Kex2p putativa. Sin embargo, mi opinión es que la especificidad de Kex2p es algo más complicada, y más aún en *Aspergillus*, como se comenta más adelante. De hecho, así como en el precursor del factor α de apareamiento sólo hay sitios dibásicos de procesamiento (L-D-K-R- para el primero, M-Y-K-R- para los situados entre dos copias del factor α), en la otra proteína modelo, la toxina asesina, además de un sitio dibásico (V-A-K-R-), hay al menos otro monobásico, L-L-P-R-, que bien pudiera ser cortado por Kex2p (Bostian et al., 1984). En esta misma línea, han ido apareciendo trabajos en los que se ha ido demostrando que la especificidad de Kex2p es efectivamente más compleja que el mero corte en sitios con secuencias dibásicas. Por una parte, mediante el estudio directo de la proteína purificada de *S. cerevisiae*, se apunta a una doble especificidad para residuos básicos o alifáticos en P4, que ayudaría a la especificidad primaria en P1 (Rockwell y Fuller, 1998); por otra parte, se ha visto la capacidad para cortar tras una sola arginina proteínas propias o heterólogas producidas en *S. cerevisiae* o *P. pastoris* (Rourke et al., 1997; Rockwell y Fuller, 1998; Werten et al., 1999).

Se ha caracterizado una pro- α -sarcina activa: la protección frente a la toxina depende de la translocación efectiva al retículo endoplásmico

Como se ha expuesto, se ha conseguido copurificar, junto con la α -sarcina madura, una forma pro que presenta 6 residuos extra en su extremo amino. Aunque, como se ha dicho, no se puede afirmar que sea la única forma intermedia en el procesamiento del precursor, pues podría haber otra forma con 8 residuos de secuencia pro, sí es muy significativo que esta forma sea ribonucleolíticamente activa frente a un homopolinucleótido (figura 26).

Este resultado permite obtener conclusiones acerca de la protección de los ribosomas del organismo productor. Se puede descartar la hipótesis según la cual tendría lugar la coproducción de un inhibidor específico (Lamy y Davies, 1991; Lamy et al., 1992; Kao y Davies, 1995), ya que las levaduras no

producen ribotoxinas y, por tanto, es harto improbable que *P. pastoris* produzca un inhibidor específico para estas proteínas que le proteja de su acción ribonucleolítica intracelular.

También se puede descartar otra de las hipótesis, que mantenía precisamente que el procesamiento del precursor de la ribotoxina se tendría lugar en varios pasos, de tal manera que la forma pro sería inactiva (Lamy y Davies, 1991; Lamy et al., 1992; Kao y Davies, 1995). La pro- α -sarcina que se ha purificado mantiene igual actividad ribonucleolítica que la forma madura, al menos en un zimograma frente a homopolinucleótidos (figura 26).

Por tanto, la protección de los organismos productores de ribotoxinas, tanto los hongos que las producen naturalmente como aquellos en los que se expresa de forma transgénica, parece darse mediante una eficaz compartimentación celular de la ruta de secreción. Es decir, mediante el reconocimiento efectivo del péptido señal, que conlleva la translocación cotraduccional de la proteína que se está sintetizando en el ribosoma. Para esta translocación es necesario el reconocimiento del péptido señal y la formación de un complejo, denominado translocón, que es el encargado de dicha translocación.

Producción de otra proteína extracelular por *Aspergillus giganteus*, la proteína antifúngica (AFP)

Ya en la descripción inicial de la purificación de la α -sarcina se comentaba la producción extracelular por parte de la misma cepa de *Aspergillus giganteus* de otra proteína, que inhibía el crecimiento de algunos hongos, por lo que se denominó proteína antifúngica (AFP; Olson y Goerner, 1965). Esta proteína es pequeña y muy básica, por lo que se copurifica con la α -sarcina en la primera etapa, de intercambio iónico, separándose cuantitativamente en la cromatografía de penetrabilidad; de esta forma, a pesar de que no se conocía mucho sobre su actividad o propiedades, se obtenían grandes cantidades. No se estudió mucho más sobre esta proteína hasta principios de esta década, en que se describió su estructura primaria (Nakaya et al., 1990) y la secuencia del gen correspondiente (Wnendt et al., 1990, 1994).

Los cultivos que se realizan para la obtención de α -sarcina se suelen detener después de 80 ó 100 horas, cuando la cantidad de esta proteína en el medio extracelular es máxima. Sin embargo, se observó, en las alícuotas que se extraían para realizar el seguimiento del cultivo, que tras tiempos más

cortos de incubación, en torno a 40 ó 60 horas, había una forma ligeramente mayor de la AFP, que se observaba en electroforesis (PAGE-SDS) y que reaccionaba en las inmunotransferencias con anticuerpos frente a AFP (figura 33). De esta forma, si se reduce el tiempo de cultivo se puede purificar esta otra forma mayor (que se denominó según la abreviatura en inglés. *larger form*, lf-AFP), que se separa también cuantitativamente, tanto de la α -sarcina como de la AFP, en la cromatografía de penetrabilidad en la columna de Biogel P10 (figura 34).

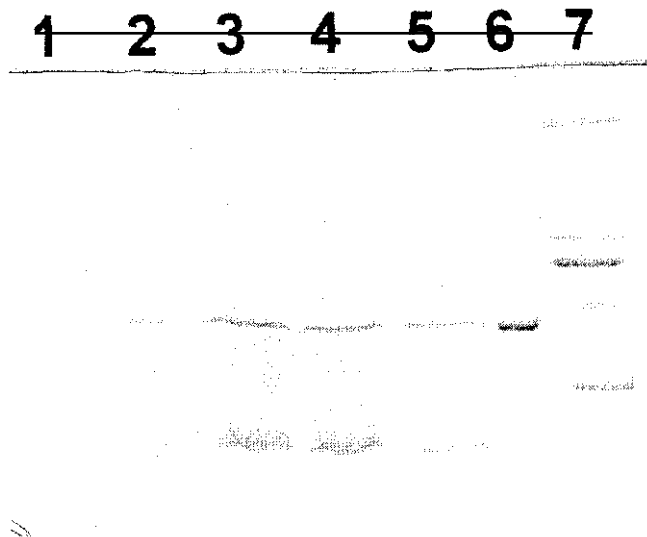


Figura 33: PAGE-SDS del medio extracelular de un cultivo de *A. giganteus* MDH 18894 tomado a distintos tiempos: 1: 24 h; 2: 48 h; 3: 60 h; 4: 75 h; 5: 120 h. 6: α -sarcina pura; 7: patrones de masa molecular (Bio-Rad).

Las dos proteínas así purificadas son homogéneas según lo observado tanto en la electroforesis (figura 34; las bandas más débiles corresponden a formas diméricas), como tras la secuenciación de sus extremos amino. Ésta dio como resultado, para la proteína menor, Ala-Thr-Tyr-Asn-Gly, que es la misma secuencia descrita para la AFP (Nakaya et al., 1990); y Asp-Glu-Ser-Ala-Val-Leu-Ala-Thr, en el caso de la forma mayor. Esta secuencia, al compararla con la deducida del cDNA, se corresponde con una proteína con seis aminoácidos más en el extremo amino. El análisis de aminoácidos de la lf-AFP, al compararlo con el de la AFP (tabla 13), confirma la presencia de seis aminoácidos extra (Asx, Ser, Glx, Ala, Val, Leu), que se corresponden con los seis aminoácidos presentes en la secuencia. Las masas moleculares de la lf-AFP y de la AFP se estimaron en 7,0 y 6,0 kDa respectivamente, mediante PAGE-SDS, lo que se corresponde con la masa deducida de la secuencia y del análisis de aminoácidos. Sin embargo, cuando se estiman mediante cromatografía de penetrabilidad en una columna Superdex 75 con el sistema FPLC, se obtienen valores de 8,1 y 6,0 kDa (figura 35).

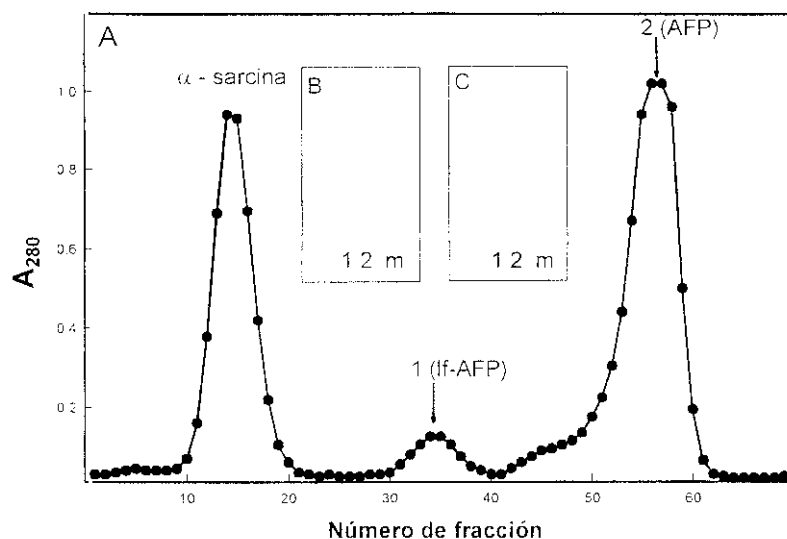


Figura 34: A: perfil de elución de la cromatografía en Biogel P-10 de la fracción conteniendo α -sarcina, If-AFP y AFP, proveniente de la cromatografía en Amberlita IRC50. B: PAGE-SDS de alícuotas, reducidas con DTT, de los dos picos de la cromatografía, marcados como 1 y 2. C: Inmunodetección de las muestras de B con anticuerpos frente a AFP. m: patrones preñidos de masa molecular (Bio-Rad). En ambas muestras se ve una banda minoritaria de mayor masa molecular, correspondiente a una forma dimérica.

Tabla 13: Composición de aminoácidos obtenida para la AFP y la If-AFP, y la resta de ambas

	AFP	If-AFP	AFP *	If-AFP - AFP
Asx	5,1	6,2	5	1,1
Thr	1,9	1,9	2	0,0
Ser	1,9	2,9	2	1,0
Glx	2,1	3,2	2	1,1
Pro	1,4	1,1	1	-0,3
Gly	4,3	4,5	4	0,2
Ala	3,9	5,2	4	1,3
Cys	n.d.	n.d.	8	-
Val	1,0	1,9	1	0,9
Met	0,0	0,0	0	0,0
Ile	1,9	1,9	2	0,0
Leu	0,1	1,1	0	1,0
Tyr	5,7	5,9	6	0,2
Phe	1,0	1,1	1	0,1
His	0,3	0,2	0	-0,1
Lys	11,6	12	12	0,4
Arg	1,0	1,0	1	0,0

* Composición deducida de la secuencia primaria (Nakaya et al., 1990)

Todo indicaba que se trataba de otro ejemplo de procesamiento de toxinas proteicas extracelulares en el mismo hongo, por lo que, dentro del contexto de los objetivos planteados en esta Tesis, resultó interesante estudiar también este sistema.

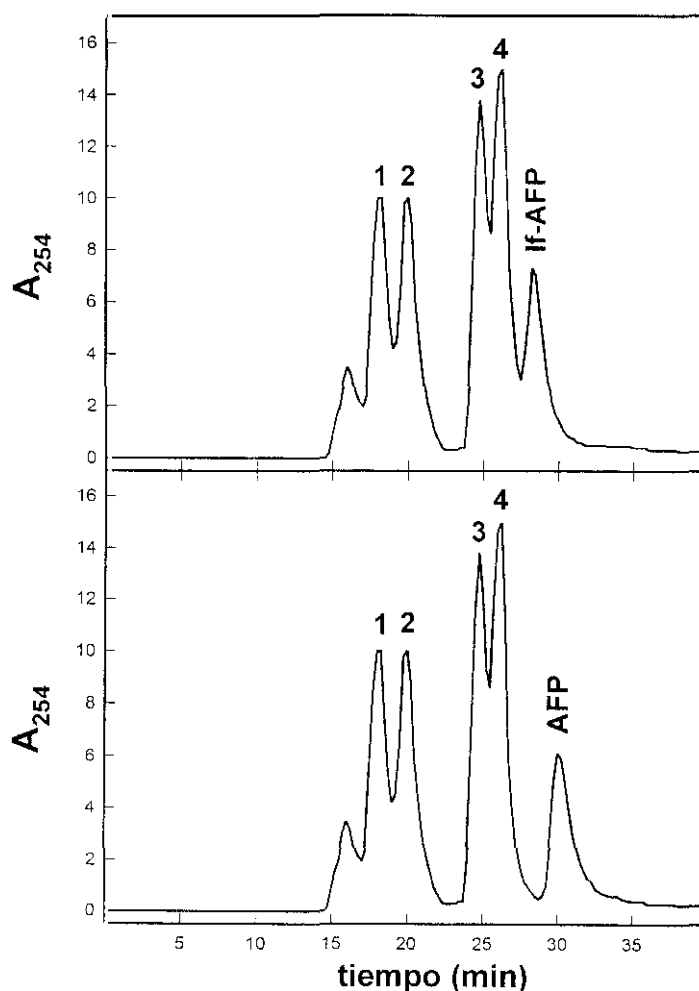


Figura 35: Estimación de la masa molecular de AFP y l1-AFP nativas mediante FPLC de penetrabilidad en una columna de Superdex 75. Se muestran dos cromatogramas de muestras conteniendo una mezcla de proteínas patrón y l1-AFP (arriba) o AFP (abajo). Las proteínas patrón son: 1: BSA (66,2 kDa); 2: ovoalbúmina (45,0 kDa); 3: mioglobina (17,8 kDa); 4: citocromo C equino (12,3 kDa).

La AFP representa un nuevo grupo de péptidos antifúngicos

Gracias a los estudios sobre la estructura primaria de la proteína y su gen (Nakaya et al., 1990; Wnendt et al., 1990 y 1994) se sabía ya que presentaba cuatro puentes disulfuro entre sus 51 aminoácidos (lo que supone una masa molecular de 5780), así como abundantes tirosinas y lisinas (6 y 12 residuos, respectivamente). Estas características, así como su carácter antifúngico, recuerdan otros grupos de proteínas similares. Por ejemplo, las tioninas (Bruix et al., 1993), una familia de proteínas de unos 5 kDa (Bloch y Richardson, 1991), ricas en puentes disulfuro y muy básicas (excepto la crambina; Teeter et al., 1981), que se encuentran en el endosperma de varias Gramíneas (Böhlman y Apel, 1991) y que parecen tener un importante papel en la defensa de estas plantas, ya que son tóxicas para bacterias, hongos filamentosos, levaduras, y células animales y vegetales. También se parece a las defensinas, otro grupo de péptidos catiónicos, que tienen entre 29 y 34 aminoácidos y tres puentes disulfuro, y que son el componente mayoritario de los gránulos azulófilos (Ganz et al., 1990); son tóxicas frente a distintos organismos o sistemas celulares como bacterias, hongos, virus, y líneas celulares neoplásicas (Rao et al., 1992; Fujii et al., 1993). Sin embargo, si se comparan sus secuencias, no existe apenas similitud entre ellas.

De hecho, hasta hace poco sólo se conocía la estructura primaria y génica de otra proteína homóloga a la AFP de *A. giganteus*, la proteína antifúngica de *Penicillium chrysogenum* (abreviada PAF), cuya existencia había sido descrita por dos grupos distintos (Vollebregt et al., 1994; Marx et al., 1995). La proteína madura de este gen presenta un 43% de identidad con la AFP (figura 41). Muy recientemente se acaba de publicar la secuencia de aminoácidos de otra proteína antifúngica similar, purificada del medio extracelular de *A. niger*, que se ha denominado Anafp (Lee et al., 1999).

Por tanto, la AFP no pertenece a ninguno de los dos grupos mencionados (tioninas y defensinas), pero sí puede ser considerada como un miembro más del grupo de toxinas proteicas de pequeño tamaño, organizadas estructuralmente en torno a un núcleo con tres o cuatro puentes disulfuro, en el que habría que incluir también toxinas de arácnidos, insectos, anémonas de mar y venenos de serpientes (Matsuyana et al., 1990; Wilcox et al., 1993; Blandin et al., 1994; García et al., 1994; Lee et al., 1994).

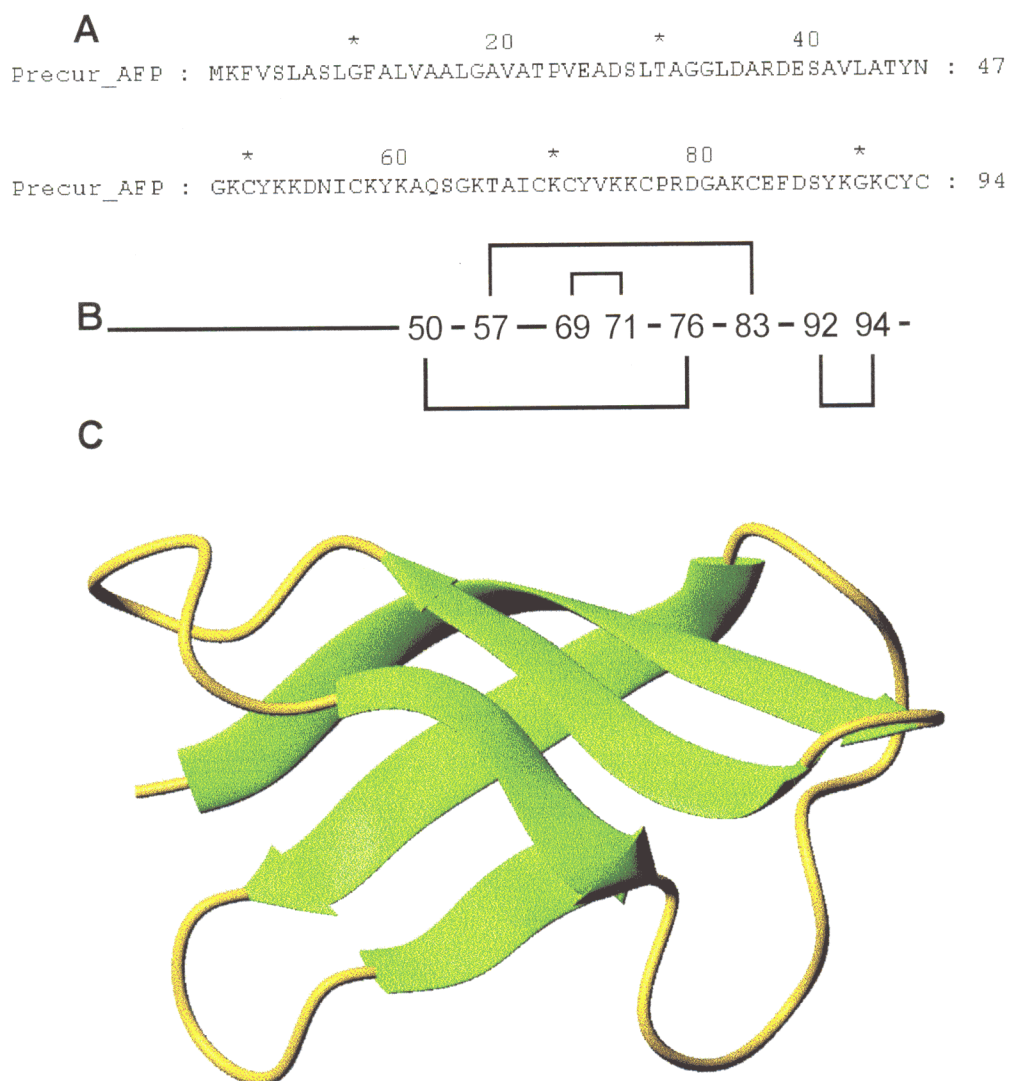


Figura 36: Estructura de la AFP. **A:** Secuencia del precursor (Wnendt et al., 1994). **B.** Esquema de los puentes disulfuro propuestos originalmente (Nakaya et al., 1990); la numeración es la del precursor. **C:** Modelo de cinta de una conformación de la estructura tridimensional en disolución, determinada por RMN (Campos-Olivas et al., 1995a y b).

Esta hipótesis pareció confirmarse cuando se determinó la estructura tridimensional de la AFP en disolución, mediante RMN. Ésta se organiza en torno a cinco cadenas β antiparalelas que forman una barril β pequeño y compacto, con cuatro puentes disulfuro internos (figuras 36 y F028; Campos-Olivas et al., 1995a y b; Campos Olivas, 1997). En el momento de su determinación, no se conocía ninguna estructura similar, salvo uno de los

dominios de la nucleasa de *Staphylococcus aureus*, y ya se vio que no se parecía a la de las tioninas y defensinas (Campos-Olivas et al., 1995a). En la actualidad, existe toda una colección de proteínas parecidas agrupadas en un patrón de plegamiento, denominado «OB-fold» (por *oligonucleotide/oligosaccharide-binding*). A pesar de la extraordinaria similitud estructural, ninguna de ellas presenta secuencias parecidas a la de la AFP. Es más, la mayoría no contiene residuos de cisteína. La posibilidad de que la AFP ejerciese su acción a través de su capacidad para interactuar con ácidos nucleicos, como hacen algunas de estas proteínas, se está estudiando en este momento en nuestro laboratorio.

Caracterización de las dos formas extracelulares de la proteína antifúngica

Cuando se emprendió el trabajo descrito a continuación, se conocía la secuencia y la estructura tridimensional de la AFP, pero no se sabía prácticamente nada acerca de sus función biológica y de sus características bioquímicas y espectroscópicas. Ciertamente, este planteamiento es poco usual, y no se habría llevado a cabo la caracterización descrita si no se hubiese observado, al determinar su estructura (Campos-Olivas et al., 1995a), que se trataba de una proteína con características muy sugerentes, y si no se hubiese detectado la presencia de la forma de mayor masa molecular (If-AFP). Inicialmente, se optó por llevar a cabo una caracterización funcional, en términos de su actividad antifúngica, y posteriormente, se completó su caracterización bioquímica y estructural.

En cuanto a la actividad biológica, y en colaboración con el grupo de la Dra. Covadonga Vázquez, del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de esta Universidad, se estudió el efecto de la AFP (hasta una concentración 0,2 mM) sobre 21 especies de microorganismos, incluyendo procariotas y eucariotas. No se observó ningún efecto frente a levaduras y bacterias, y sí frente a algunas de las especies de hongos experimentadas, en concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) entre 6 y 25 μ M (ó 127 μ M para *Trichoderma harzianum*; tabla 14). Hay que destacar que no se observó ningún efecto frente a *A. giganteus*, *A. niger* o *Penicillium chrysogenum*, por lo que se puede decir que los hongos productores también están protegidos frente a la acción de estas toxinas. Entre los hongos afectados se encuentran algunos fitopatógenos, lo que abre la puerta a la posibilidad de utilizar esta proteína como un agente de control biológico frente a plagas de determinadas plantas, lo que ya se está estudiando mediante alguna colaboración ya comenzada.

Tabla 14: Concentraciones mínimas inhibitorias de AFP y lf-AFP frente a aquellos microorganismos, de los descritos en la tabla 11, que fueron sensibles en las concentraciones ensayadas

Organismo	MIC frente a AFP (μ M)	MIC frente a lf-AFP
<i>Trichoderma koningii</i>	6	ma
<i>Trichoderma harzianum</i>	127	-
<i>Penicillium purpurogenum</i>	10	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	7-25	ma

ma: MIC mayor que las concentraciones ensayadas (hasta 0,2 mM)

La actividad antifúngica de la lf-AFP se analizó únicamente frente a las especies más sensibles, *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma koningii*, ya que se purifica en mucho menor cantidad. Los valores de inhibición (MIC) obtenidos para la lf-AFP son, por lo menos, 30 veces mayores que los de la AFP, lo que sugería que la lf-AFP fuese un precursor inactivo de la proteína.

En cuanto a la caracterización estructural, se empezó por estudiar su susceptibilidad a la degradación por parte de muy diversas proteasas. Como parecía augerir su estructura tridimensional, la AFP nativa resultó ser muy resistente a la proteólisis. En condiciones no desnaturizantes y a 37 °C, no se observa degradación por tripsina, pepsina, termolisina o la proteasa de SV-8. Con pronasa sólo se observa una degradación parcial, lo que también sucede con la subtilisina. En el caso de esta última enzima, si se digiere la lf-AFP, y se consiguió, además, la eliminación de los seis aminoácidos del extremo amino (figura 37). La proteinasa K degrada la molécula, pero los fragmentos permanecen unidos por los puentes disulfuro (el patrón en HPLC de fase inversa es idéntico a la AFP sin digerir, pero la separación se observa en PAGE-SDS si la muestra se reduce previamente con 2-mercaptoetanol al 5%). Esta gran compacidad de la molécula podría serle útil para «sobrevivir» en el medio extracelular, donde la presencia de proteasas es frecuente. Sin embargo, la AFP reducida y carboxiamidometilada sí es sensible a las proteasas experimentadas, por lo que esta compacidad de la molécula parece requerir la integridad de los puentes disulfuro u otras interacciones de la estructura terciaria que puedan ser afectadas por la disrupción de los mismos.

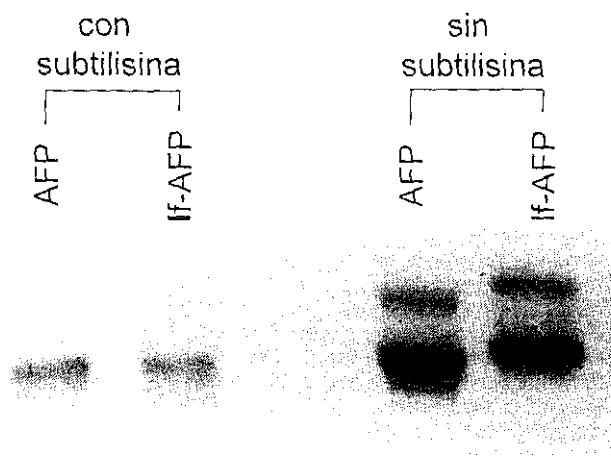


Figura 37: PAGE-SDS de 10 μg de AFP o If-AFP tras digestión o no con subtilisina.

También se llevó a cabo la caracterización espectroscópica de la AFP. En primer lugar, se registró el espectro de absorción UV-visible, donde se observa un máximo a 276 nm y un hombro en torno a 283 nm, típicos de los residuos de tirosina (la proteína no tiene triptófano). El coeficiente de absorción ($E^{0.1\%}$) a 278 nm resultó ser de $1,76 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, algo mayor que el calculado teóricamente para los cromóforos presentes, seis tirosinas y dos puentes disulfuro ($1,49 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Sin embargo, al reducir y carboxiamidometilar la proteína, el coeficiente real ($1,37 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) sí se iguala al teórico para seis tirosinas ($1,39 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). En cuanto al espectro de emisión de fluorescencia cuando se excita a 275 nm, se observa una banda centrada en 303 nm, como cabe esperar de la contribución de las tirosinas, poco sensibles a variaciones en la polaridad de su entorno. No se observa emisión cuando se excita a 295 nm, como corresponde a la ausencia de triptófano. La emisión de fluorescencia es 1,7 veces mayor en la proteína reducida y carboxiamidometilada, lo que muestra la existencia de una desactivación dependiente de la conformación de la proteína, que podría darse por la presencia de enlaces peptídicos, o grupos amino o carbonilo participando en enlaces de hidrógeno o transferencia de protones con el grupo fenólico de las tirosinas. En la tabla 15 se recogen posibles grupos implicados en esta desactivación estructural, según se deduce de las coordenadas de la estructura obtenida mediante RMN (Campos-Olivas et al., 1995a y b).

Tabla 15: Posibles grupos desactivantes de la fluorescencia, localizados a una distancia de entre 3 y 4 Å de cada residuo de tirosina en la AFP.

Residuo	Grupos desactivantes posibles
Tyr3	Enlace peptídico Ala 18-Gln 19 Enlace peptídico Gln 19-Ser 20
Tyr8	ϵ -H ₃ N ⁺ de Lys 15 γ -COO ⁻ de Asp 36
Tyr16	Enlace peptídico Thr 23-Ala 24 Enlace peptídico Ala 24-Ile 25
Tyr29	Ninguno
Tyr45	α -H ₃ N ⁺ de Ala 1 Enlace peptídico Ala 1-Thr 2
Tyr50	γ -COO ⁻ de Asp 43

En el espectro de dicroísmo circular (CD) en el UV próximo de la AFP se observa un máximo de elipticidad a 280 nm, y un mínimo a 253 nm (figura 38). Este espectro se debe a los cromóforos de la proteína que absorben en esta región y parece lógico pensar que el pico positivo corresponde a las tirosinas, y el negativo a los puentes disulfuro, por las longitudes de onda a las que aparecen. El espectro de CD en el UV lejano suele ser muy útil para estudiar la estructura secundaria de una proteína, ya que generalmente la elipticidad puede relacionarse con la conformación de los enlaces peptídicos. En el caso de la AFP, sin embargo, no es posible. El espectro está dominado por un máximo a 230 nm (con una elipticidad media por residuo de 6000 grado·cm²·dmol⁻¹; figura 38A). La reducción y carboxiamidometilación de la proteína (RC-AFP) elimina esta banda positiva, por lo que esta contribución está relacionada con la proteína nativa. Es bastante infrecuente que se den bandas positivas a esta longitud de onda, aunque el éster N-acetil-etílico de L-Tyr también presenta una banda positiva en esta región (figura 38C). De hecho, otras proteínas presentan bandas similares, que han sido atribuidas a las cadenas laterales de las tirosinas (Schechter et al., 1971; Cann, 1972; Woody, 1972; Day, 1973). Más concretamente, se ha atribuido esta característica a proteínas con bajo contenido en hélice α y con Tyr y Phe cuyas cadenas laterales estén agrupadas (Manning y Woody, 1989; Freskgard et al., 1994). Según la estructura de la AFP, esto podría suceder, pues no tiene hélice α , y los residuos Tyr3, Tyr16 y Phe42 están bastante próximos (Campos-Olivas et al., 1995a y b). Este resultado se corroboró con el estudio de la variación del espectro de CD en función del pH, como se explica a continuación. Por último, cuando se estudió su desnaturalización térmica mediante calorimetría (DSC),

no se observó ninguna transición conformacional en el intervalo de 25-80 °C (DSC), lo que indica que se trata de una proteína extraordinariamente termorresistente. La presencia de los cuatro puentes disulfuro explica esta observación, dado el pequeño tamaño de la AFP.

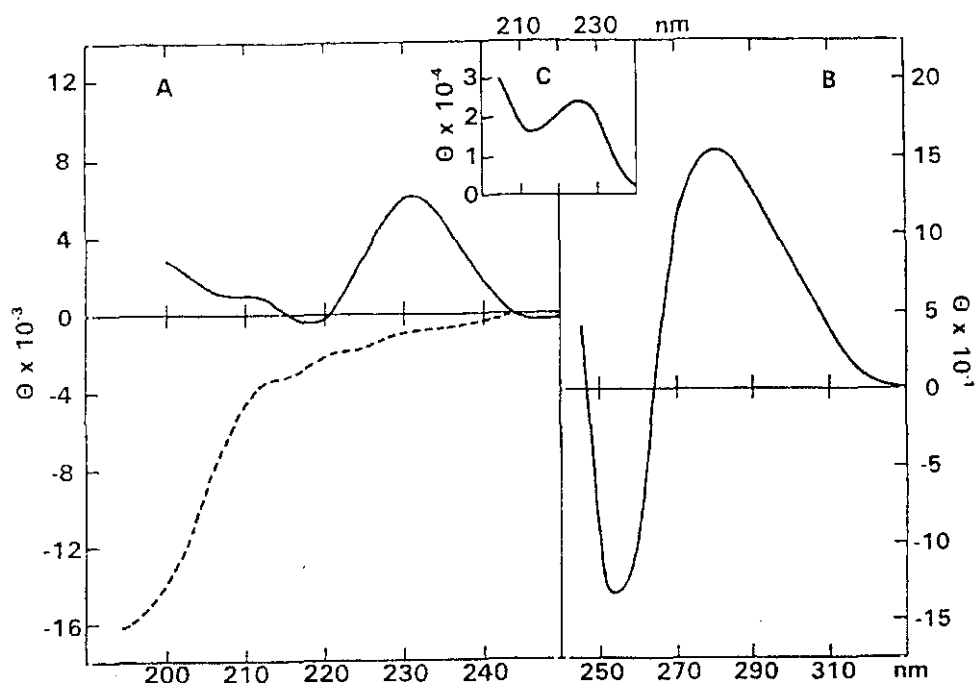


Figura 38: A: Espectro de CD en el UV lejano de AFP (línea continua) y RC-AFP (línea discontinua). B: Espectro de CD en el UV próximo de AFP. C: Espectro de CD en el UV lejano del éster etílico de N-acetil-L-tirosina. Los valores de elipticidad (Θ) están en grados $\cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ por residuo de aminoácido.

La variación conformacional inducida por el pH era especialmente interesante, dada la gran resistencia de la AFP a la desnaturalización térmica y a la proteólisis. Para ello, se analizaron las variaciones observadas en su absorbancia, su emisión de fluorescencia y el CD en el UV lejano (figura 39). Como se puede apreciar, la conformación nativa de la proteína se mantiene entre valores de pH de 3 y 8. Se observa claramente la titulación de los seis residuos de Tyr en el intervalo de pH entre 9 y 13. El incremento de la absorbancia a 295 nm es típico de la aparición de tirosinatos. El fenol de la Tyr libre tiene un pK_a cercano a 10, que aumenta cuando este residuo se encuentra poco accesible en el interior de la proteína. Así, dada la curva de titulación obtenida, parece que habría distintos grados de accesibilidad de las Tyr de la AFP. Esto concuerda con los datos de la estructura de la proteína en disolución, obtenida mediante RMN, en la que los residuos Tyr3, Tyr8 y Tyr16 presentan

valores de accesibilidad entre el 13 y el 25%, mientras que Tyr29, Tyr45 y Tyr50 tienen valores entre el 35 y el 43% (Campos-Olivas et al., 1995a). También por emisión de fluorescencia se observa esta titulación de las Tyr, dándose una disminución de la emisión a 303 nm a la vez que un aumento de la emisión a 340 nm (esta última debida al tirosinato, y de menor rendimiento cuántico). A pH mayor de 11 se observa muy poca emisión de fluorescencia, lo que podría indicar que la población de Tyr menos accesible a la titulación es también la más desactivada. En cuanto al espectro de CD, también permite observar esta titulación ya que, a pH mayor de 9, la banda de elipticidad a 230 nm va desapareciendo progresivamente, desplazándose hacia 245 nm cuando la titulación progresa, lo que confirma la preponderancia de los residuos de Tyr en dicho espectro (figura 39B).

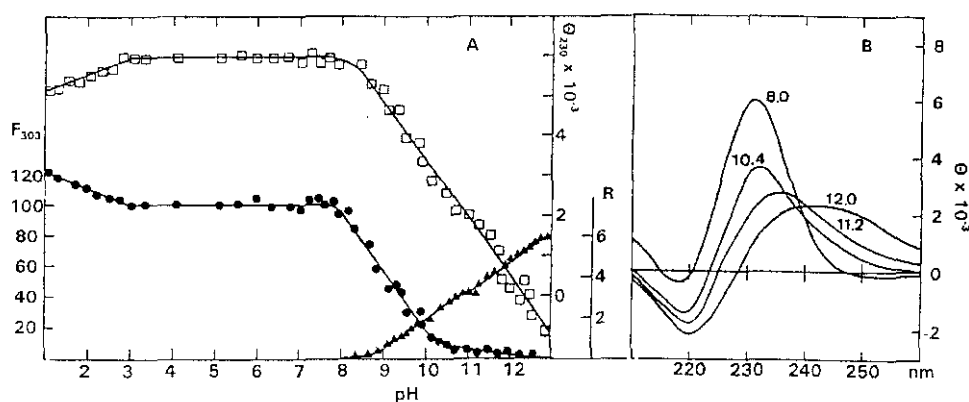


Figura 39: Estudio espectrofotométrico de las transiciones conformacionales de la AFP inducidas por el pH. **A:** Emisión de fluorescencia a 303 nm (F_{303} , ●) en unidades arbitrarias, para excitación a 275 nm; relación molar tirosinato/proteína (R , ▲) deducida de la absorbancia a 295 nm; variación de la elipticidad molar por residuo de aminoácido a 230 nm (Θ_{230} , □), en grados·cm²·dmol⁻¹. **B:** Espectros de CD en el UV lejano de AFP a los pH indicados.

En cuanto a la lf-AFP, también se caracterizó espectroscópicamente, aunque no con tanto detalle, ya que presenta idénticos espectros de absorbancia y de emisión de fluorescencia, y sólo se observan pequeñas diferencias con respecto a la AFP en el espectro de CD en el UV lejano (figura 40), atribuibles a la presencia de los seis residuos adicionales. En cuanto a la disposición de éstos en la estructura de la proteína, se predice para ellos una conformación en hélice α . Teniendo en cuenta que la AFP es una molécula muy compacta, con forma de barril β , muy resistente a la hidrólisis, es lógico pensar que los residuos extra en la lf-AFP formen un segmento helicoidal, lo que facilitaría su hidrólisis en el medio extracelular para dar la AFP. Es muy probable que este pequeño segmento helicoidal no quede bien empaquetado. Probablemente, se

trata de una estructura que sobresale con respecto a la estructura global de la AFP. Ello explicaría las discrepancias observadas (ya comentadas) al calcular la masa molecular en condiciones nativas o desnaturalizantes, así como la mayor susceptibilidad de este extremo amino de la If-AFP a la hidrólisis por subtilisina.

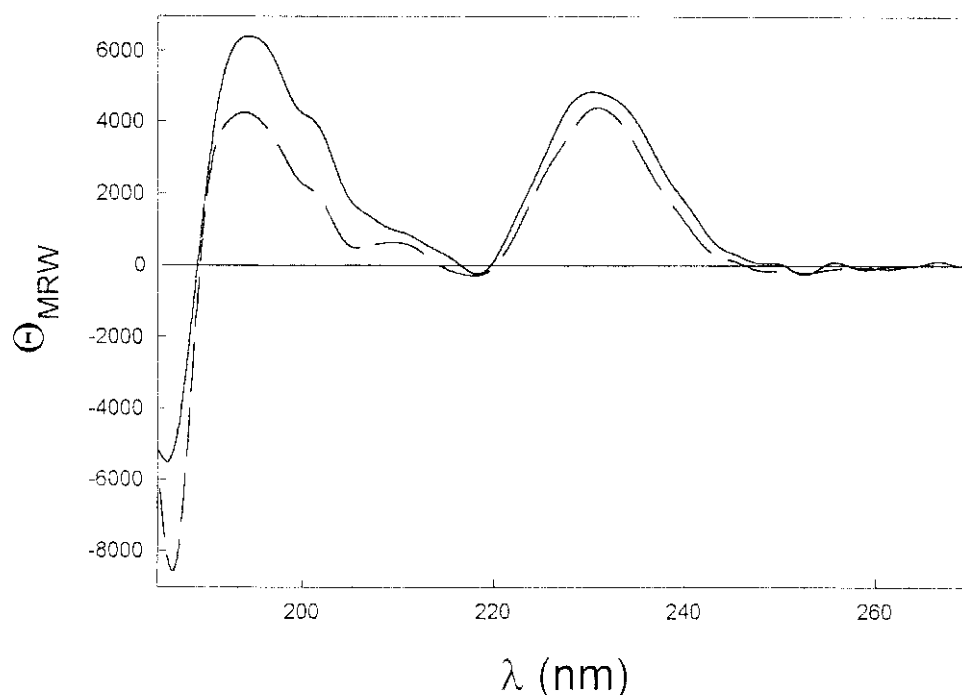
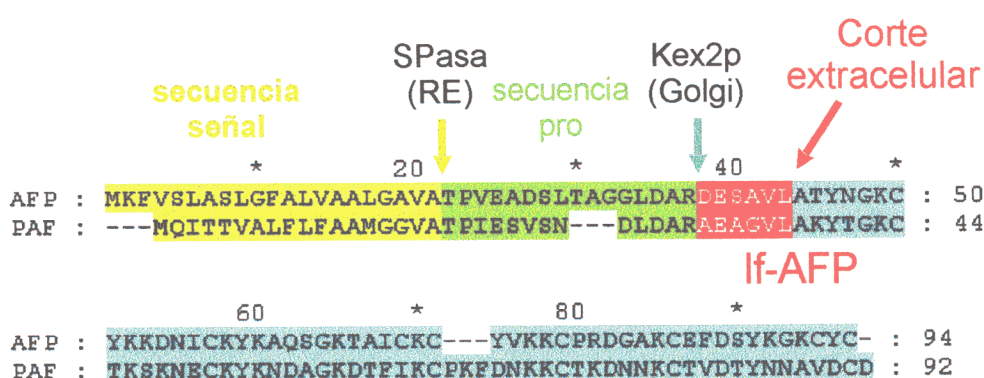


Figura 40: Espectros de CD en el UV lejano de AFP (línea continua) y If-AFP (línea discontinua), ambas a 0,1 mg/ml.

Finalmente, ¿cómo explicar la presencia de esta forma mayor de la AFP, que desaparece con el tiempo, y que es mucho menos activa? La explicación que parece más razonable es que la If-AFP es la forma que secreta el hongo, quizá como un precursor inactivo, que se hidroliza extracelularmente para producir la AFP activa. No es fácil predecir si la hidrólisis extracelular se produce de forma específica o quizá por algún mecanismo general, dado que la AFP es una proteína muy resistente a la acción de proteasas u otros agentes desestabilizantes. Los hongos *Aspergillus* producen varias proteasas extracelulares similares a la subtilisina (Jaton-Orgay et al., 1992; Moutaouakil et al., 1993), por lo que no sería raro que la hidrólisis del precursor se realizara por una de esas proteasas.

La forma precursora completa de la AFP contiene 94 aminoácidos (Wnendt et al., 1990; figura 41). Si se quitan los 57 aminoácidos

correspondientes a la lf-AFP, quedaría un péptido líder de 37 residuos. A la vista del mismo, y teniendo en cuenta lo que ya se sabía sobre la α -sarcina, se puede discutir cuál debe ser el procesamiento que sufre esta proteína hasta completar su secreción. En primer lugar, la peptidasa señal cortaría la proteína tras la Ala 21 (figura 41), dejando una proproteína de 73 aminoácidos, que se translocaría al retículo endoplásmico para incorporarse a la ruta de secreción. En el aparato de Golgi se hidrolizaría la secuencia pro por una proproteína convertasa, que cortaría tras la Arg 37 (figura 41). El sitio de corte de la proproteína convertasa sería, de hecho, muy similar al de la α -sarcina y al de otras proteínas de *Aspergillus*, como se describe a continuación. Quedaría así la lf-AFP, que es la proteína que se secreta al medio extracelular, donde es finalmente activada al hidrolizarse la secuencia hexapeptídica del extremo amino, quedando la AFP madura.



Proteína antifúngica madura

Figura 41: Alineamiento de las secuencias de los precursores de la AFP y la PAF, y esquema de los pasos del procesamiento proteolítico. SPasa: peptidasa señal; RE: retículo endoplásmico.

De la secuencia del precursor descrito de la PAF, la proteína antifúngica de *Penicillium chrysogenum*, se puede deducir que el procesamiento sería similar (de la Anafp, la proteína antifúngica de *A. niger*, sólo se conoce la secuencia de la proteína madura). El alineamiento de las secuencias de ambos precursores, deducidos de los correspondientes cDNA, revela que también puede existir una forma mayor extracelular de la PAF, lf-PAF, con seis aminoácidos extra, ya que la secuencia pro que quedaría entonces presenta el mismo sitio de corte, tras -Leu-Asp-Ala-Arg-, que en la AFP (figura 41). Incluso, observando los geles de electroforesis publicados en el trabajo original sobre la caracterización de la PAF (Marx et al., 1995), se puede ver la presencia de una banda mayor que la PAF madura, si bien los autores del trabajo no

realizan ningún comentario al respecto. Por lo tanto, parece ser que la presencia de esta forma mayor, extracelular, podría ser común a las proteínas de esta familia que representa la AFP.

La especificidad de la proproteína convertasa de *Aspergillus*

Así como del procesamiento de la α -sarcina en *Pichia* se podían obtener conclusiones sobre la especificidad de la proproteína convertasa homóloga a Kex2p en este organismo, del procesamiento de las proteínas extracelulares en *Aspergillus* podemos extraer conclusiones sobre la especificidad de la convertasa homóloga.

En efecto, si bien la secuencia pro de la α -sarcina sólo es cortada parcialmente en *P. pastoris*, en *A. giganteus* es cortada completamente, como parece lógico. También pasa lo mismo con el precursor de la AFP, que tiene un sitio de corte muy similar para la proproteína convertasa del tipo de la Kex2p, únicamente cambiando el tipo de residuo ácido en P3 (figura 41). Por eso, cuando se observó la presencia de este sitio de corte similar en la If-AFP, se decidió analizar cómo eran los sitios de procesamiento en precursores de secreción de secuencia conocida en hongos *Aspergillus*, lo que se muestra en la figura 42. De esta observación se dedujo la existencia de un motivo común como sitio de procesamiento, definido por la secuencia consenso Ile/Leu-Asp/Glu-Ala-Arg-.

Por otra parte, desde que se empezaron a utilizar los hongos filamentosos para la secreción de proteínas heterólogas (pues presentan ventajas por su gran capacidad de producción de proteínas de secreción), se sabe que los sitios «clásicos» de corte por Kex2p, en los que está presente un sitio dibásico, son reconocidos en *Aspergillus*, y son insertados intencionadamente para que se produzca el procesamiento proteolítico en la ruta de secreción (Contreras et al., 1991; Punt et al., 1998). Así, se puede concluir que la especificidad del sitio de corte por proproteína convertasas es más amplia en hongos *Aspergillus*, lo que podría ser debido a la existencia de una única proproteína convertasa menos estricta, o a la presencia de varias convertasas con especificidades ligeramente distintas.

-5	-4	-3	-2	-1	1	2	3	4	5	6	7	8	
					Asp	Glu	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Thr	lf-AFP (secuencia obtenida del extremo amino)
Gly	Leu	Asp	Ala	Arg	Asp	Glu	Ser	Ala	Val	Leu	<u>Ala</u>	Thr	AFP; <i>A.giganteus</i> (Wendt et al., 1994)
Asp	Leu	Asp	Ala	Arg	Ala	Glu	Ala	Gly	Val	Leu	<u>Ala</u>	Lys	PAF; <i>Penicillium chrysogenum</i> (Marx et al., 1995)
Pro	Leu	Asp	Ala	Arg	<u>Ala</u>	Thr	Trp	Thr	Cys	Ile	Asn		restricocina & mitogilina; <i>A.restrictus</i> (Fernández-Luna et al., 1985; Lamy et al., 1991)
Pro	Leu	Glu	Ala	Arg	<u>Ala</u>	Val	Thr	Trp	Thr	Cys	Leu	Asn	α -sarcina; <i>A.giganteus</i> (Oka et al., 1990)
Glu	Leu	Glu	Ala	Arg	<u>Asp</u>	Ser	Cys	Thr	Phe	Thr	Ser	Ala	poligalacturonasa A; <i>A.flavus</i> (Whithead et al., 1995)
Pro	Ile	Glu	Ala	Arg	<u>Asp</u>	Ser	Cys	Thr	Phe	Thr	Thr	Ala	poligalacturonasa II; <i>A.niger</i> (Bussink et al., 1990)
Pro	Ile	Glu	Ala	Arg	<u>Gly</u>	Ser	Cys	Thr	Phe	Lys	Thr	Ala	poligalacturonasa II; <i>A.tubigenensis</i> (Rutkowski et al., 1991)
Glu	Leu	Glu	Ala	Arg	<u>Asp</u>	Ser	Cys	Thr	Phe	Thr	Ser	Ala	poligalacturonasa; <i>A.parasiticus</i> (Cary et al., 1995)
Pro	Leu	Glu	Glu	Arg	<u>Ala</u>	Ala	Thr	Trp	Thr	Cys	Met	Asn	clavina; <i>A.clavatus</i> (Parente et al., 1996)
Pro	Leu	Asp	Iys	Arg	<u>Thr</u>	Lys	Val	Ala	Ser	Cys	Ser	Gly	metaloaproteinasa de 24 kDa; <i>A.flavus</i> (Ramesh et al., 1995)
Pro	Ile	Glu	Pro	Arg	<u>Gln</u>	Ala	Ser	Val	Ser	Ile	Asp	Ser	endo(1,4) β -xilanasasa A; <i>A.awamori</i> (Ito et al., 1992)
Val	Leu	Val	Ser	Arg	<u>Ser</u>	Ala	Gly	Ile	Gln	Tyr	Val	Gln	endo(1,4) β -xilanasasa C; <i>A.awamori</i> (Ito, 1994)
Ser	Leu	Val	Glu	Arg	<u>Ala</u>	Cys	Asp	Tyr	Thr	Cys	Gly	Ser	RNasa T1; <i>A.oryzae</i> (Fujii et al., 1994)
Gln	Leu	Thr	Arg	Arg	<u>Thr</u>	Glu	Val	Thr	Asp	Cys	Lys	Gly	proteasa neutral II; <i>A.oryzae</i> (Tatsumi et al., 1991)
Glu	Leu	Val	Glu	Arg	<u>Gly</u>	Ser	Ser	Cys	Thr	Phe	Thr	Ser	poligalacturonasa B; <i>A.flavus</i> (Whitehead et al., 1994)
Glu	Leu	Lys	Ala	Arg	<u>Asp</u>	Ser	Cys	Thr	Phe	Thr	Ser	Ala	poligalacturonasa; <i>A.oryzae</i> (Kitamoto et al., 1993)

Figura 42: Secuencia obtenida del extremo amino de la lf-AFP, y estructura primaria en la zona de límite entre la proteína madura y el péptido líder para diferentes proteínas extracelulares de hongos *Aspergillus*, según las secuencias de DNA descritas. Está subrayado el primer residuo de la proteína madura. Recuadrada está la secuencia consenso propuesta para el corte por la proproteína convertasa.

C - Actividad ribonucleolítica

La secuencia de la α -sarcina se conoce desde el año 1983 (Sacco et al., 1983). Ya desde entonces, y mediante estudios de alineamiento con las estructuras primarias de otras ribonucleasas, se ha supuesto que su mecanismo catalítico sería análogo al de la mayoría de las RNasas conocidas, especialmente las superfamilias de la RNasa A y la RNasa T1 (Sacco et al., 1983; Martínez del Pozo et al., 1988; Mancheño et al., 1995a). De acuerdo con ello, la reacción del enlace fosfodiéster transcurriría en dos etapas, con la formación de producto intermedio con el fosfato unido ciclicamente en 2' y 3', como se explica en la introducción (figura 45). La determinación de la estructura tridimensional de la α -sarcina (Campos-Olivas et al., 1996a y b; Pérez-Cañadillas et al., 1999 y 2000) abundó en esta previsión, pues los residuos considerados como catalíticos en las ribonucleasas microbianas no tóxicas de la familia de la RNasa T1 se pueden alinear estructuralmente con los equivalentes de la α -sarcina (figura 3), como se había predicho (Mancheño et al., 1995a).

Sin embargo, la carencia de un ensayo ribonucleolítico suficientemente simple y cuantitativo había impedido la caracterización del mecanismo enzimático de la α -sarcina. Por razones casi idénticas, en las fechas en que se comenzó el trabajo presentado en esta Tesis, no se había conseguido demostrar de forma directa el papel de los residuos potencialmente catalíticos. Únicamente se había descrito que la sustitución de la His137 por Gln (H137Q) resultaba en la producción de una proteína estructuralmente idéntica a la α -sarcina nativa, pero incapaz de hidrolizar los ribosomas o degradar un homopolinucleótido en zimograma (Lacadena et al., 1995). Este problema se resolvió mediante la producción de nuevos mutantes, así como gracias a la adaptación de un ensayo nuevo a la caracterización de la α -sarcina. Los resultados obtenidos, que se presentan a continuación, permitieron concluir que esta proteína es una ribonucleasa ciclante ácida y, además, permitieron asignar papeles concretos a los residuos más importantes del centro activo.

La α -sarcina es una ribonucleasa ciclante

A la hora de adaptar un ensayo ribonucleolítico sencillo y fácilmente cuantificable para la α -sarcina, había básicamente dos posibles sustratos: dinucleótidos o nucleótidos cíclicos 2':3'. Es decir, los sustratos de la primera o de la segunda reacciones que llevan a cabo las ribonucleasas ciclantes para romper el enlace fosfodiéster. Se optó por utilizar dinucleótidos con base

púricas, concretamente ApA y GpA, porque mimetizan mejor el sitio de corte natural, obteniendo además como producto el sustrato de la segunda reacción. En algún estudio, también se ha utilizado directamente el nucleótido cíclico 2':3'.

En cuanto a cómo detectar el avance de la reacción, hay esencialmente dos procedimientos. Uno consiste en el registro de la variación de absorbancia de la mezcla de reacción, determinando previamente la variación de absorbancia que existe entre el sustrato y los productos; estas variaciones están descritas para la mayoría de nucleótidos. Este método tiene la ventaja de ser muy sencillo y relativamente rápido. Con la RNasa U2 sí se ha utilizado, con el ApA como sustrato, pero no se puede aplicar a la α -sarcina, porque presenta una eficacia catalítica muy baja, y la reacción es demasiado lenta para poder registrarla adecuadamente.

Así, la opción que quedaba era separar los productos y cuantificarlos, con la ventaja añadida de que se puede estudiar en detalle el mecanismo catalítico, además de los parámetros cinéticos de la reacción global. El mejor método para separación era la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), detectando y cuantificando los productos mediante la medida de su A_{254} . Por tanto, se adaptó un gradiente de elución para poder separar cuantitativamente los distintos productos de la reacción, como se ejemplifica en la figura 43. Para identificar los picos, y determinar los coeficientes de respuesta de los distintos productos, se aplicaron distintas cantidades de los productos comerciales correspondientes.

Al tratarse de un tiempo de reacción tan largo (14-16 h) se pensó que podría tener lugar una hidrólisis no enzimática, o existir una ribonucleasa contaminante. Para descartar ambas hipótesis, se hicieron distintos controles. Por una parte, en las reacciones sin enzima no se apreció la degradación del dinucleótido, ni tampoco del nucleótido cíclico cuando se ensayó éste. Por otra, se analizaron lotes de α -sarcina distintos y de distinto origen, bien purificada del hongo original, bien de *E. coli*, obteniéndose resultados similares. Para descartar efectos del tampón se probaron, al mismo pH, tampón Tris y fosfato, obteniendo asimismo idénticos resultados.

Por tanto, se utilizó este método para estudiar el mecanismo catalítico de la α -sarcina, caracterizando enzimáticamente la reacción con los dinucleótidos. Para ello, se ensayaron distintas concentraciones de sustrato (ApA o GpA) con una cantidad fija de enzima (3 μ M), durante 14,5 h a temperatura ambiente y pH 7,5, obteniendo los parámetros enzimáticos de la reacción según el modelo de Michaelis-Menten (tabla 16). Se comprobó,

previamente, que la respuesta era lineal en el intervalo de tiempo y concentraciones utilizado.

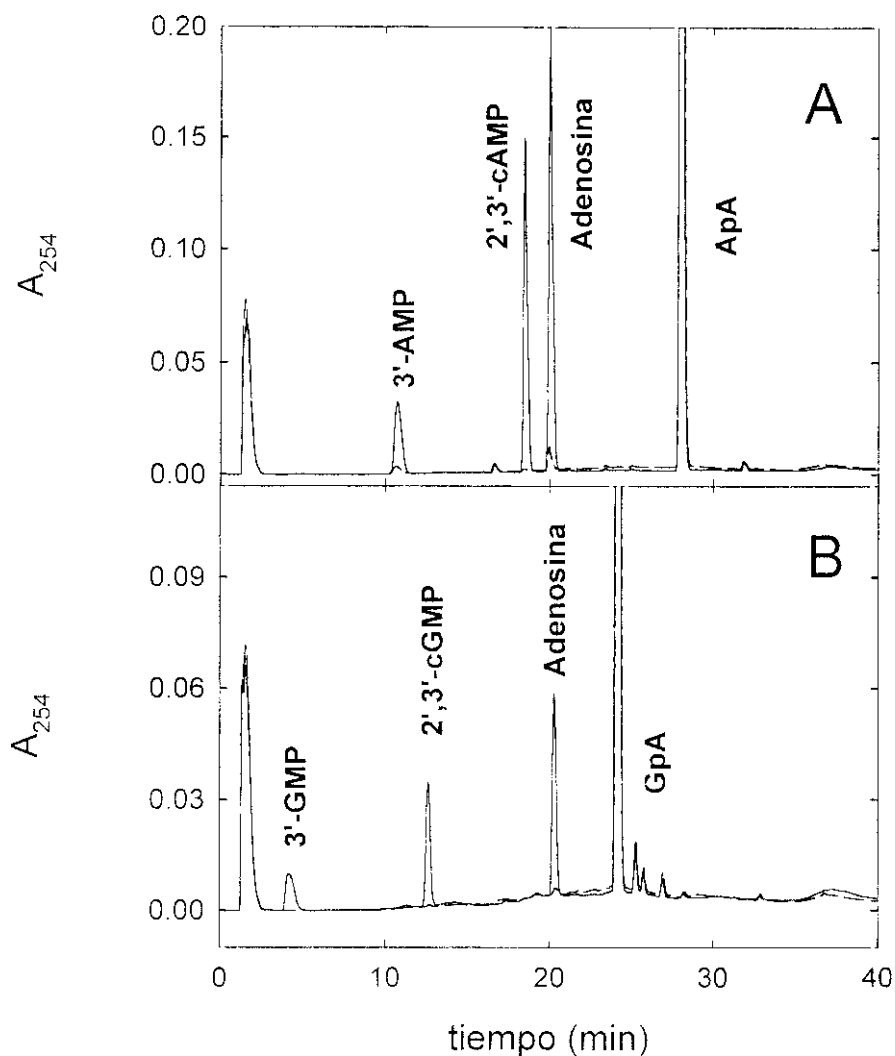


Figura 43: Separación por HPLC de los productos de la reacción resultantes de la incubación de ApA 180 μ M (A) o GpA 270 μ M (B) en presencia de α -sarcina 3,8 μ M, durante 16 h a temperatura ambiente. Las líneas discontinuas corresponden a la separación de una incubación equivalente en ausencia de α -sarcina.

Tabla 16: Constantes cinéticas de la α -sarcina frente a dinucleótidos

Sustrato	K_M (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)
ApA	40,0	1×10^{-4}	2,5
GpA	3,6	9×10^{-6}	2,5

De acuerdo con estos resultados, se puede deducir que la α -sarcina presenta una mayor afinidad por GpA que por ApA, lo que se corresponde con el enlace natural que cortan las ribotoxinas en el ribosoma, entre guanina y adenina. La K_M aparente calculada para la reacción con el ribosoma es muy parecida, 5,3 μM (Endo et al., 1983). También hay que destacar los muy bajos valores de la k_{cat} y de la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M). Esto confirma que los dinucleótidos no son un sustrato óptimo para la α -sarcina, que reconoce con mucha mayor eficiencia el enlace presente en el SRL, para lo que necesita otros determinantes añadidos. No se puede decir, sin embargo, que estemos ante una reacción no enzimática, puesto que se hicieron, como ya se ha descrito, los controles necesarios para descartar esa posibilidad.

Los distintos productos de la reacción se cuantificaron en las separaciones por HPLC, lo que aportó evidencias para dilucidar el mecanismo catalítico. Así, la suma de 2',3'-cAMP y 3'-AMP (o 2',3'-GMP y 3'-GMP) obtenidos era siempre igual a la adenosina producida (figura 44), como era de esperar. No se obtenían cantidades apreciables de 2'-AMP (o 2'-GMP), lo que permite descartar también una hidrólisis no enzimática del intermedio cíclico. Al ensayar la α -sarcina con 2',3'-cAMP se obtuvo únicamente 3'-AMP.

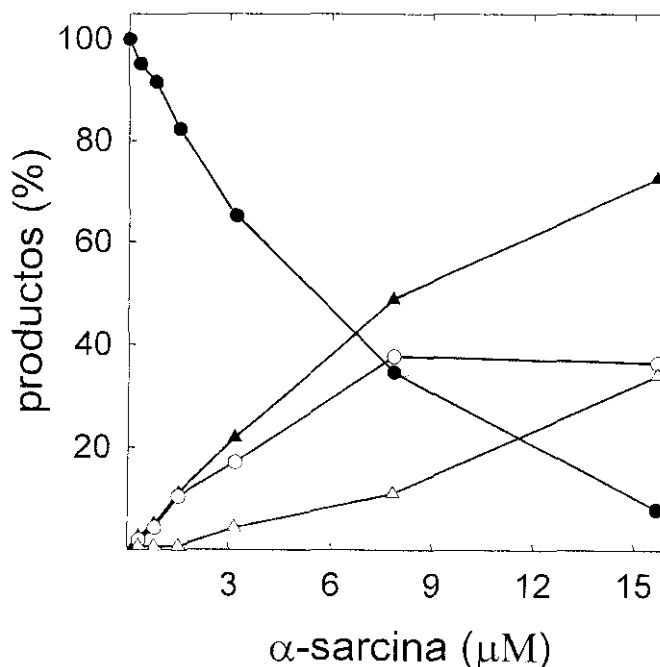


Figura 44: Porcentaje de los distintos productos de la reacción de ApA con distintas cantidades de α -sarcina durante 18 h a temperatura ambiente: ApA (●), adenosina (▲), 2',3'-cAMP (○) y 3'-AMP (Δ).

Esta reacción, la hidrólisis del intermedio cíclico, también se podría cuantificar, pero resulta extremadamente lenta en comparación con la transesterificación, lo que también sucede con las otras RNAsas ciclantes, hasta el punto de que se ha llegado a cuestionar su papel en la reacción global (Cuchillo et al., 1993; Thompson et al., 1994b; Loverix et al., 1998; Raines, 1998). Además, si se incubaba 3'-AMP durante 18 h con α -sarcina 3 μ M, se forma una pequeña cantidad del intermedio cíclico, lo que muestra la reversibilidad de la hidrólisis.

Estos resultados confirmaron, por tanto, que la α -sarcina actúa mediante un mecanismo de tipo ciclante análogo al de la RNasa T1, que transcurriría en dos etapas: una primera la transfosforilación de ApA (o GpA), que daría adenosina y 2',3'-cAMP (o 2',3'-cGMP), seguida por la hidrólisis del nucleótido cíclico formado al correspondiente derivado 3'-monofosforilado (figura 45).

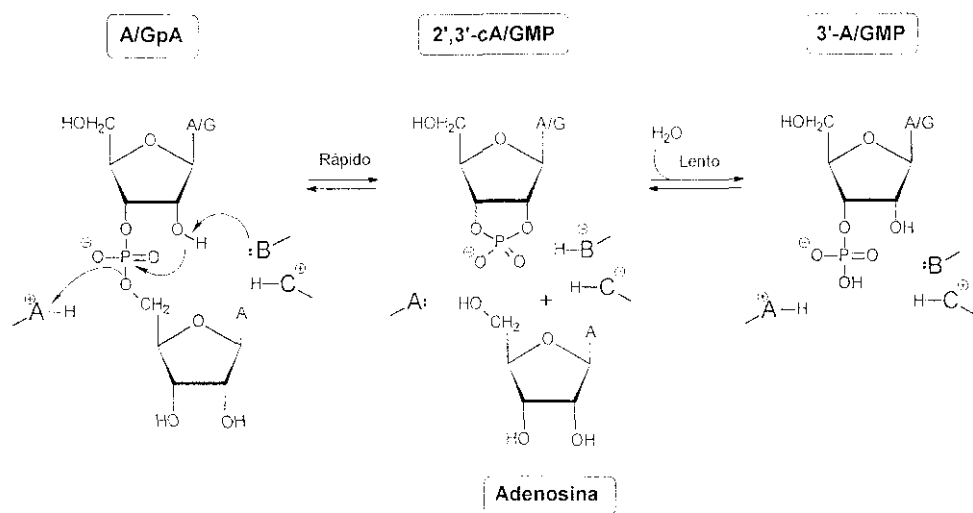


Figura 45: Mecanismo ciclante de la α -sarcina ejemplificado en la reacción con un dinucleótido. **A** sería el residuo que actúa como ácido general en la transfosforilación, y **B** la base general, que se corresponderían en la α -sarcina con His 92 y Glu 58. **C** sería la His 50.

La α -sarcina es una ribonucleasa ácida

El desarrollo de este sencillo ensayo cuantitativo con dinucleótidos permitió, además, estudiar el comportamiento enzimático de la α -sarcina frente al pH, lo cual es especialmente interesante puesto que su mecanismo se basa en la utilización de ácidos y bases generales. Este estudio no se había podido realizar hasta entonces debido a la complejidad de su sustrato natural, el ribosoma.

De esta forma, se midió la actividad de la α -sarcina frente a ApA a distintos valores de pH, comprendidos entre 3,0 y 8,0 (figura 46), lo que permitió observar que el pH óptimo era 5,0. Hay que destacar este resultado puesto que, hasta entonces, se realizaban todos los ensayos de actividad a pH próximos a la neutralidad. Para descartar un posible distorsión de los resultados por la presencia de otra ribonucleasa contaminante, se realizó un zimograma con poli(A), pero a pH 4,5. Puesto que se seguía observando una única banda activa, correspondiente a la α -sarcina, se concluyó que efectivamente esta ribotoxina se comporta como una ribonucleasa ácida.

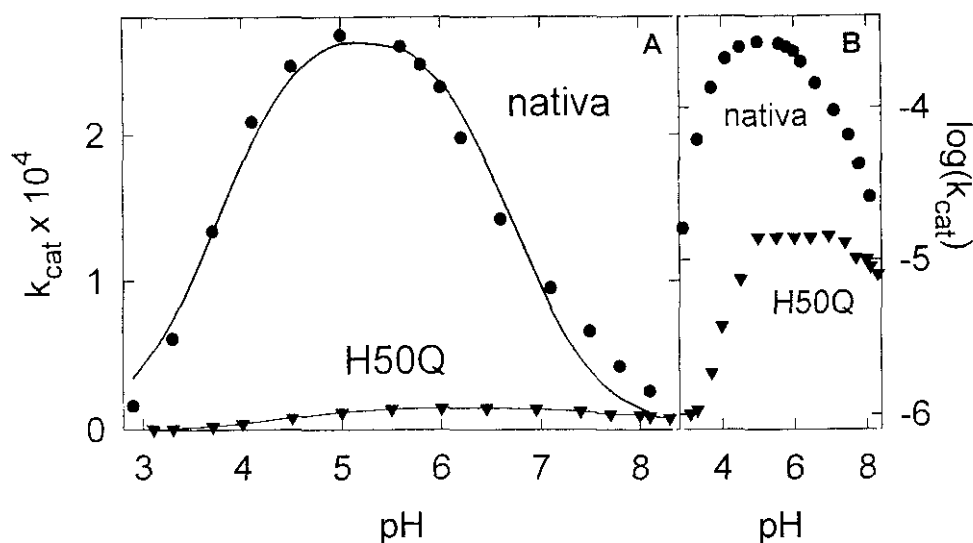


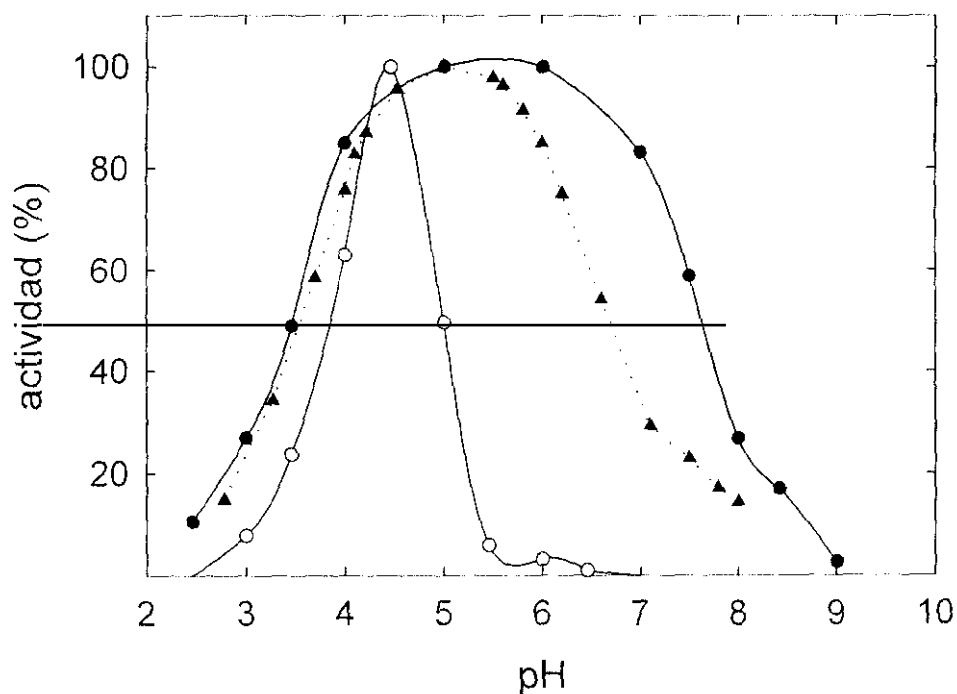
Figura 46: A: dependencia con el pH de la actividad (k_{cat}) de la α -sarcina (•) y el mutante H50Q (▼) en la transesterificación de ApA. Las líneas corresponden al ajuste considerando dos equilibrios de ionización. B: el mismo resultado en forma semilogarítmica.

Finalmente, se determinaron también las constantes catalíticas para la transesterificación de ApA a pH 5,0. Al compararlas con las correspondientes a pH 7,0 se ve que la k_{cat} se duplica, permaneciendo constante la K_M (tabla 17).

El hecho de que la α -sarcina fuese una RNasa de actividad ácida supuso una sorpresa. Siempre se había asumido que el pH neutro era el óptimo para la actividad de las ribotoxinas, sin duda por influencia de su similitud con la RNasa T1, la más estudiada de la superfamilia. Sin embargo, hay que recordar que la RNasa U2, cuyo pH óptimo es 4,5 (figura 47), es más cercana en estructura primaria y secundaria, apareciendo como intermedia en el árbol filogenético de la superfamilia. Así, la α -sarcina se parece también en su pH óptimo a la RNasa U2, lo que aumentó el interés por el estudio de esta última proteína.

Tabla 17: Constantes catalíticas de la α -sarcina nativa y su mutante H50Q frente a ApA, a dos pH distintos

pH 7,0			
	K_M (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)
Nativa	40 ± 4	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$2,5 \pm 0,4$
H50Q	38 ± 4	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-5}$	$0,3 \pm 0,1$
pH 5,0			
	K_M (μ M)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)
Nativa	40 ± 4	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$5,0 \pm 0,7$
H50Q	45 ± 4	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-5}$	$0,3 \pm 0,1$

**Figura 47:** Perfiles de actividad ribonucleolítica en función del pH de α -sarcina frente a ApA (---; este trabajo), RNasa T1 frente a GpC (—•—; Osterman y Walz, 1978) y RNasa U2 frente a RNA de levadura (—○—; Arima et al., 1968a). En los tres casos se ha normalizado porcentualmente respecto al máximo de actividad correspondiente.

La His 137 y el Glu 96 son los residuos que catalizan la reacción ácido-base

La RNasa A es una de las proteínas mejor caracterizadas, tanto desde un punto de vista funcional, como estructural y, por ello, constituye uno de los modelos enzimáticos de referencia. En el caso de esta ribonucleasa, se conoce inequívocamente que los residuos directamente responsables de la catálisis ácido-base, que conduce a la ruptura de los enlaces fosfodiéster del RNA, son dos histidinas, la 12 y la 119 (delCardayré et al., 1995; Cuchillo et al., 1997). La reacción catalizada transcurre por el mismo tipo de intermedios que en el caso de la RNasa T1 y la α -sarcina (figura 45). Sin embargo, los residuos implicados en el caso de la T1 son diferentes. Durante la primera etapa, la formación del producto cíclico 2':3', el Glu 58 actúa como la base general, mientras que la His 92 se comporta como el ácido general. Durante la segunda etapa, la hidrólisis del derivado cíclico, ambos residuos intercambian sus papeles (figura 45). De hecho, este par Glu/His es el más común dentro de las ribonucleasas microbianas (Nonaka et al., 1993), incluida la α -sarcina, como se demuestra en esta Tesis. Además, se ha descrito cómo otra His, la 40, participa en la estabilización del estado de transición de la primera etapa de la reacción catalizada por la RNasa T1 (Steyaert et al., 1990; Steyaert, 1997); estos aspectos se revisan en la introducción.

Como ya se ha comentado, estos tres residuos se encuentran conservados en las ribotoxinas (Mancheño et al., 1995a) y, en el caso de la α -sarcina, se corresponderían con la His 137, el Glu 96 y la His 50. Por tanto, se asumía que la α -sarcina actuaría de manera idéntica a la RNasa T1, en lo referente a su capacidad de hidrolizar un enlace fosfodiéster, ya que no en cuanto a su especificidad. Sin embargo, cuando el grupo de RMN del Instituto de Estructura de la Materia (CSIC) calculó los pK_a individuales de estos residuos mediante RMN (Pérez-Cañadillas et al., 1998), se obtuvieron valores sensiblemente distintos a los obtenidos para la RNasa T1 (tabla 18). Esto concordaba con el hecho de que el comportamiento enzimático de la RNasa T1 en función del pH fuera sensiblemente distinto al de la α -sarcina (figura 47).

Por todo ello, se pensó en utilizar el ensayo frente a dinucleótidos, combinado con la producción de toda una serie de mutantes, para asignar definitivamente un papel a cada uno de los residuos considerados hasta entonces como catalíticos, y para explicar el comportamiento de la α -sarcina como ribonucleasa. Los mutantes elegidos fueron aquellos en los que la His 137, el Glu 96 o la His 50 se reemplazaron por Gln (llamados H137Q, E96Q y H50Q, respectivamente). Además, se preparó un doble mutante, sustituyendo

Tabla 18: pKa aparentes de residuos catalíticos de la α -sarcina y de la RNasa T1

residuo	α -sarcina	
	actividad enzimática frente a ApA	RMN (Pérez-Cañadillas et al., 1998)
		nativa
His 50	7,8 (7,4-8,0)	7,7 \pm 0,2
Glu 96	3,7 (3,7-3,8)	5,2 \pm 0,1
His 137	6,2 (5,9-6,4)	5,8 \pm 0,1
residuo	RNasa T1	
	RMN, según referencias	
	Inagaki et al., 1981	Steyaert et al., 1990; McNutt et al., 1990
His 40	7,9 \pm 0,01	7,7-7,9 \pm 0,2
Glu 58	4,3 \pm 0,05	4,1 \pm 0,2
His 92	7,8 \pm 0,01	7,4 \pm 0,2

las dos histidinas (H50/137Q) y un triple mutante (H50/137/E96Q). La preparación, producción y aislamiento de estas cinco variedades mutadas de la α -sarcina, así como su caracterización estructural y actividad frente a ribosomas, fueron objeto de otra Tesis Doctoral anterior (Lacadena, 1997) y han sido publicadas recientemente, junto con los estudios que se presentan a continuación (Lacadena et al., 1999). De acuerdo con estos resultados, todas ellas mantendrían su estructura nativa, pero habrían perdido su capacidad para hidrolizar los ribosomas, demostrándose así su participación en la catálisis. Los resultados aquí presentados, posteriores, conciernen al estudio de la capacidad de estos mutantes para hidrolizar ApA, así como a la influencia del pH en esta reacción.

Cuando los cinco mutantes mencionados se ensayaron utilizando ApA como sustrato, tanto a pH 5,0 como a pH 7,0, únicamente se observó una hidrólisis significativa del dinucleótido en el caso de la variante H50Q. En la tabla 17 se resumen las características cinéticas del mismo, a ambos pH, comparándolas con las de la α -sarcina natural. Como se puede observar, esta mutación reduce la k_{cat} en un orden de magnitud, mientras que no se aprecian diferencias significativas con respecto a la K_M . Ello indicaba que la His 50 también está implicada en la catálisis per se, y no en la unión del sustrato (al

menos de forma directa), si bien su papel debía ser menos importante que el de los otros dos residuos, His 137 y Glu 96, ya que la sustitución de éstos anulaba por completo la capacidad de la proteína para hidrolizar un enlace fosfodiéster

El estado de ionización de los grupos involucrados en una catálisis ribonucleolítica de tipo ciclante es crucial, ya que se lleva a cabo por cesión de protones. Por este motivo, se profundizó en el estudio de la influencia del pH y se caracterizó también el comportamiento de H50Q (figura 46). Tanto en el caso de la α -sarcina fúngica como en el de H50Q, cuando se representa el log de k_{cat} frente al pII, se obtiene una curva en la que tanto las pendientes ascendentes como descendentes son iguales a, o menores que, la unidad, en valor absoluto. Ello sugiere que en la reacción de transesterificación (la primera etapa) están implicados un único grupo ácido y otro básico. En el caso de la RNasa T1, sin embargo, son dos ácidos y dos básicos (Steyaert, 1997). Se admite que la representación de k_{cat} frente al pH refleja las ionizaciones que son las etapas limitantes de la reacción en el complejo enzima-sustrato (Fersht, 1998). Por ello, el ajuste de esta curva permitió calcular los pK_a de los supuestos dos residuos catalíticos, ácido y base, en dicho complejo, que resultaron ser de 3,8 y 6,8 para la proteína silvestre, y de 4,4 y 8,0 para H50Q (tabla 19).

Tabla 19: Parámetros obtenidos del ajuste de la dependencia de la k_{cat} de la transesterificación de ApA por α -sarcina frente al pH, y comparación con los valores de pK_a obtenidos por RMN.

	Cinética		RMN
	Nativa	H50Q	Nativa con 2'-GMP
pK_B	$3,8 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,1$	
pK_A	$6,7 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,2$	
$pK_{His\ 50}$			7,6
$pK_{Glu\ 96}$			~4,8
$pK_{His\ 137}$			6,8

^a Determinados por regresión no lineal utilizando la ecuación $k_{cat} = (k_{cat})^*/(1 + H/K_B + K_A/H)$, donde $(k_{cat})^*$ es el valor de k_{cat} independiente del pH, H es la concentración de protones, y K_A y K_B son constantes de disociación macroscópicas. La dependencia de k_{cat} con el pH se ha analizado también considerando la implicación de equilibrios de ionización de tres y cuatro residuos. Se dan también los errores estándares. ^b Constantes de disociación microscópica determinadas mediante RMN (Pérez-Cañadillas et al., 1998).

En el caso de la proteína natural, los valores obtenidos concuerdan bastante bien con los pK_a microscópicos de la His 137 y el Glu 96, calculados en el complejo formado entre la α -sarcina y el inhibidor 2'-GMP mediante

RMN (tabla 19; Pérez-Cañadillas et al., 1998). Este resultado, juntamente con la total falta de actividad de los mutantes que afectan a estos residuos, permitió concluir que la His 137 actuaría como el ácido general y el Glu 96 como la base general de la reacción de transesterificación.

Por otra parte, los valores de pK_a obtenidos en el caso de H50Q, más parecidos a lo que sería esperable para una pareja catalítica His/Glu, indicaban inequívocamente que la His 50 modula el microentorno del centro activo y es uno de los residuos responsables de las diferencias de comportamiento frente al pH con respecto a la RNasa T1. En la figura 46 se puede ver cómo el pH óptimo de este mutante se encuentra desplazado hacia valores mayores.

Por último, la diferencia más importante detectada en el comportamiento de H50Q hace referencia a la reacción de hidrólisis del producto cíclico intermedio. En el ensayo de actividad frente a ApA utilizado se pueden evaluar por separado los productos de cada una de las dos etapas de la reacción ribonucleolítica (figura 45). Así, las cantidades de adenosina y 3'-AMP, que se pueden cuantificar por separado a partir de los correspondientes cromatogramas (figura 43), dan cuenta de la extensión de la primera y segunda reacciones, respectivamente. Cuando se representa la relación 3'-AMP/adenosina lo que se está estudiando es el transcurrir de la segunda etapa, la reacción de hidrólisis del intermedio cíclico. Al representarla en función del pH (figura 48), se observa que la α -sarcina natural y H50Q se comportan de manera similar a valores de pH en torno a 5. Sin embargo, alrededor de pH 7, la reacción de hidrólisis es muy preponderante en el caso de H50Q, en comparación con lo que ocurre en la proteína silvestre. Esta diferencia puede apreciarse a simple vista en las inserciones de la figura 48, donde se muestran dos cromatogramas obtenidos a pH 7.0 para ambas proteínas. Como ocurre en la mayoría de las ribonucleasas conocidas (Loverix et al., 1998), la α -sarcina es poco eficiente a la hora de catalizar la hidrólisis del producto cíclico intermedio; tanto que, de hecho, no ha sido posible calcular los parámetros cinéticos de esta segunda etapa. Los resultados obtenidos con el mutante H50Q permiten concluir que la His 50 modula la velocidad de esta reacción y que su sustitución por Gln la acelera muy sensiblemente.

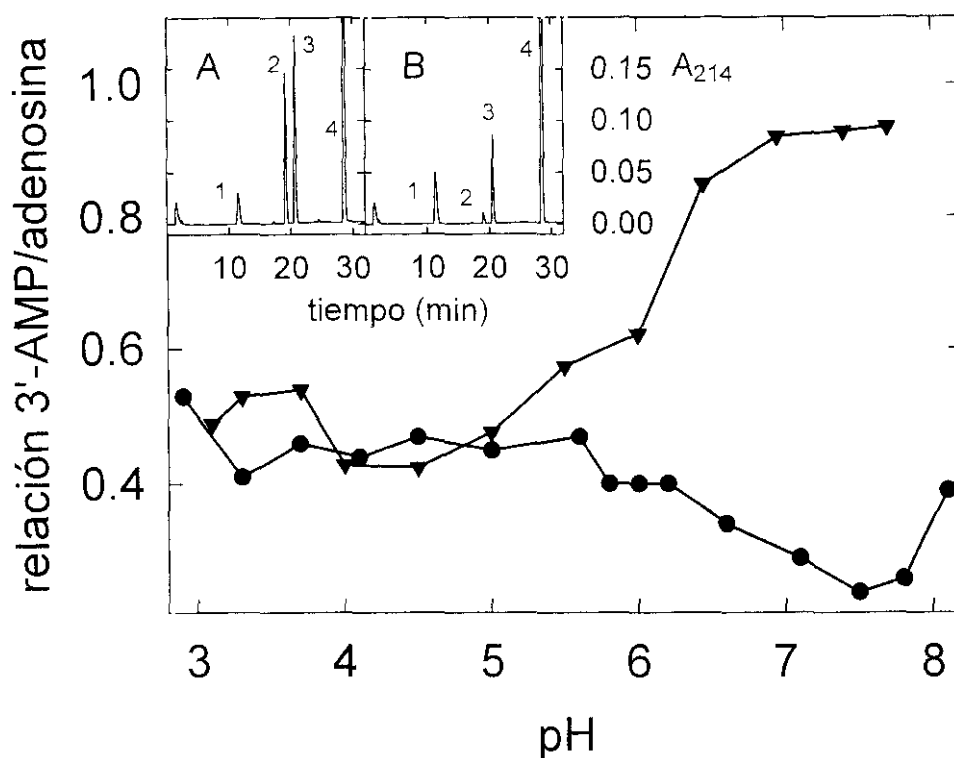


Figura 48: Dependencia con el pH de la producción de 3'-AMP (reacción de hidrólisis), expresada en términos de la relación entre 3'-AMP y adenosina producidos, en la reacción de ApA con α -sarcina (•) y el mutante H50Q (▼). **Insertión:** Separación por HPLC de los productos de la reacción de ApA 180 μ M con α -sarcina (A) o el mutante H50Q (B), en concentración 3,8 μ M, durante 14 h a temperatura ambiente. Los picos 1 a 4 corresponden a 3'-AMP, 2',3'-cAMP, adenosina y ApA, respectivamente.

D - Clonación y producción heteróloga de la ribonucleasa U2

Como ya se ha expuesto en esta Memoria, la RNasa U2 es la ribonucleasa no citotóxica y de amplia especificidad que más se parece a las ribotoxinas, lo que se concreta en varios aspectos:

- la secuencia primaria es la más parecida, lo que hace que se sitúe de forma intermedia en el árbol filogenético (figura 1),
- presenta especificidad por una base púrica a la hora de hidrolizar su fosfato en 3', como les ocurre a las ribotoxinas, a diferencia del resto de RNasas de la superfamilia de la T1 (tabla 1),
- su pH óptimo de actividad es 4,5 (figura 47).

También se debe destacar el hecho de que es producida junto con una enzima, la RNasa U1, mucho más parecida a la RNasa T1, por el mismo organismo. Esto mismo podría suceder con las ribotoxinas, como ya se ha descrito anteriormente, y permite aventurar la hipótesis de que tengan una cierta relación evolutiva. Por ejemplo, que la evolución de las ribotoxinas se haya dado a partir de un gen similar, duplicado en el genoma, lo que permitiría mantener la función que realizan las enzimas como la RNasa T1, a la vez que el gen duplicado puede tomar más libremente nuevos elementos estructurales que le confieran nuevas actividades. De hecho, esto mismo se postula para el caso de otras ribasas (ribonucleasas con funciones biológicas especiales) de la superfamilia de la RNasa A (Beintema et al., 1997; Benner et al., 1997).

Sin embargo, esta enzima no se había estudiado con las técnicas de manipulación genética tan extendidas hoy en día y, de hecho, no se conocía nada acerca de su estructura génica. Y era precisamente la posibilidad de producir formas mutantes de la proteína, especialmente quimeras en las que se incorporan los elementos extra que presentan las ribotoxinas y que las diferencian de las RNasas no citotóxicas, lo que más interesaba. Especialmente con la idea de determinar la responsabilidad de esos elementos estructurales en las funciones especiales de las ribotoxinas.

Por tanto, se abordó la clonación y producción heteróloga de la ribonucleasa U2 para lo cual había que tener en cuenta algunas peculiaridades ya conocidas de la proteína. Algunas estructurales, como su pequeño tamaño y su acidez, la presencia de tres puentes disulfuro, dos de ellos con cisteínas adyacentes en la secuencia de aminoácidos (Sato y Uchida, 1975c), o la tendencia a formar enlaces isoaspartato (Uchida y Shibata, 1981; Noguchi et al., 1995). Otras dificultades podían surgir de cara a la producción: la posible

toxicidad, como ya sucede con otras RNasas de la familia de la T1 (Hartley, 1988; Quaas, 1998; Hartley et al., 1996), o la dificultad para su procesamiento proteolítico al presentar en su extremo amino una cisteína implicada en un puente disulfuro.

Obtención del gen

Para aislar el gen, había que recurrir a la fuente original de la proteína, el hongo *Ustilago sphaerogena*. En la literatura se describen dos cepas a partir de las cuales se purificó la RNasa U2. Una de ellas es la utilizada por los grupos japoneses, tanto de la Universidad como de la empresa Sankyo, y que proviene del Dr. Dekker (Arima et al., 1968a). La otra, que no se sabe si es la misma o no, fue utilizada por Rushizky et al. (1970), y es la depositada en la ATCC con el número 12412, que a su vez se corresponde con la CBS 534.71. En nuestro caso, se optó por esta última cepa, puesto que era más fácil conseguirla.

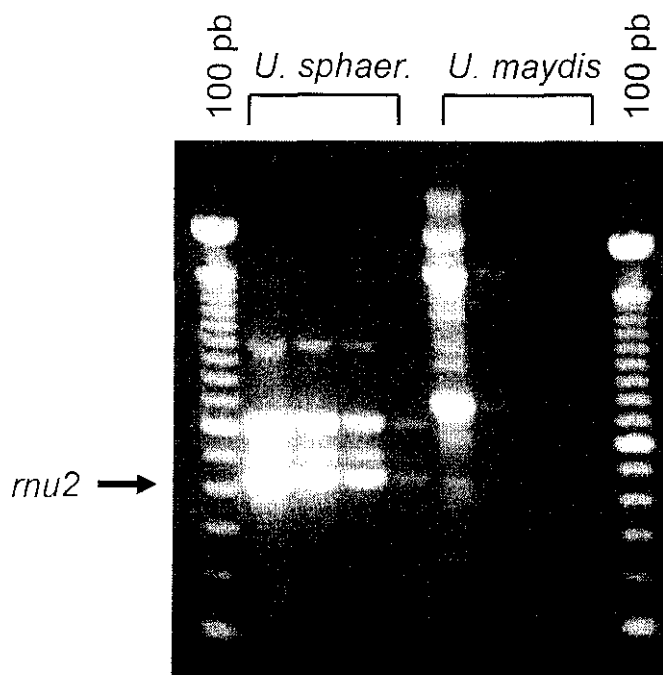


Figura 49: Amplificación por PCR del gen *rnu2*, que codifica la RNasa U2, con los oligonucleótidos U25 y U23 (la banda correspondiente se señala con una flecha). *U. sphaer.*: Amplificación a partir de cantidades decrecientes del DNA genómico de *Ustilago sphaerogena*. *U. maydis*: Amplificación, como control, a partir de cantidades decrecientes del DNA genómico de *U. maydis*. 100 pb: escalera de 100 pb que se usó como patrón de tamaños.

Así, la cepa correspondiente proveniente de la ATCC se creció en PDA, comprobándose que su morfología era la correcta con la ayuda del Dr. J. Kronstad, de la *University of British Columbia*. A continuación, se creció en 50 ml de PDB y se purificó el DNA genómico según un protocolo adaptado para *Ustilago*.

Como ya se ha dicho, no se sabía nada de la estructura génica, por lo que, para amplificar el gen, se diseñaron oligonucleótidos específicos para secuencias próximas a los extremos amino y carboxilo que fueran poco degeneradas, de acuerdo con la frecuencia de utilización de codones en genes de *Ustilago*. Dichos oligos, U2-5 y U2-3, correspondían a los aminoácidos 7 a 14 y 107 a 113 de la proteína madura. Tras la correspondiente PCR, se detectaron cuatro bandas, todas ellas mayores de lo que cabría esperar para la secuencia amplificada sin intrones (figura 49). Estas bandas se secuenciaron, y sólo la más pequeña de ellas correspondía a la que codificaría la RNasa U2 (Sato y Uchida, 1975a; Kanaya y Uchida, 1986 y 1995). El gen así obtenido se denominó *rnu2*, y presenta un intrón de 116 pb entre los codones de Pro36 y Asp37 (figura 50).

```

TGCGACATCCCTCAGTCCG CCAACTGCGGGCGCAACGTTTACTCTAACGACGACAICAAAC 60
C D I P Q S T N C G G N V Y S N D D I N 20

ACTGCCATTCAAGCGGCACITGACGACGTTGCTAACGGTGATCGTCCTGGTGACCTTTAC 120
T A I Q G A L D D V A N G D R P <<<<----- 36

TTCCCTTTGCCAAACACAACAAAACACACTTTGGCTTCCATCCCTCCTAATTTGGTTTGG 180
-----Intrón-----

CCCCGCGCGCTGACACITTTTCCCTCTGGGTCATCAICCTCAACAGACAATTATCCCTCATC 240
----->>>> D N Y P R 41

AGTACTACGATGAAGCGCTGTGAAGACATTAATCTTTGCTGTGGATCCGGTCCCTGGGTCCG 300
Q Y Y D E A S E D I T L C C G S G P W S 61

AATTCCTTCTCGTTTACAAATGGACCTTATTAATCCAGTAGAGATAAATATGTTTCTCCCG 360
R F P L V Y N G P Y Y S S R D N Y V S P 81

GCCCTGATCGTGTCACTTTATCAGACAAACACCGGAGAGTTTCTGCAACCGTCACTCATA 420
G P D R V T Y Q T N T G E F C A T V T H 101

CGGGTGACAGTAGTTACGACGGCTTCACCCAGTGGTCGTAA 461
T G A A S Y D G F T Q C S Fin 114

```

Figura 50: Estructura del gen *rnu2* con la traducción de la correspondiente secuencia de aminoácidos. Los recuadros indican la secuencia impuesta por los oligonucleótidos. Se señala el intrón, de 116 pb. Está depositada en las bases de datos EMBL/GenBank/DBBL, con el número de acceso AJ004827.

Una vez caracterizado el gen responsable de la síntesis de la RNasa U2, y de cara a preparar las estrategias de producción heteróloga de la proteína, era además necesario disponer del cDNA para así amplificar exclusivamente la secuencia codificante, sin intrón. Para ello, se estudiaron primero las condiciones de producción de RNasa U2 por parte del hongo en cultivos líquidos, tanto en el medio descrito por Arima et al. (denominado «medio *Ustilago*» o MU; Arima et al., 1968a), como en PDB. La actividad que producían los cultivos se evaluó realizando zimogramas frente a poli(A) a pH 4.5. De esta forma se vio que se producía RNasa U2 cuando se incubaba varios días y el hongo había crecido suficientemente, tanto en MU como en PDB.

Mediante ultracentrifugación en cloruro de cesio, se aisló entonces el RNA total del micelio de *U. sphaerogena* cultivado en MU durante 45 horas. A partir de 50 µg este RNA total, se sintetizó el cDNA de doble hebra usando el kit «Marathon» de Clontech. Se amplificó el gen con los mismos oligos que se usaron con el DNA genómico, obteniéndose una banda principal, cuyo tamaño era el esperado para el fragmento del gen *rnu2* sin intrón. La secuenciación de dicho fragmento confirmó que, efectivamente, se trataba de la secuencia codificante de la RNasa U2, correcta y completa.

Estrategias de producción en *Escherichia coli*

A la hora de abordar la producción heteróloga de una proteína, todavía hoy sigue siendo *E. coli* el sistema más sencillo. Por ello, y a pesar de las dificultades señaladas, se optó por intentar la clonación y expresión del gen de la RNasa U2 en esta bacteria. Para ello, se emplearon dos estrategias, basadas ambas en la secreción de la proteína recombinante, ya sea al periplasma o al medio extracelular. Así, se pretendía evitar la toxicidad que implicaría la presencia intracelular de una RNasa.

Secreción al periplasma (estrategia pINOU2)

La construcción del vector utilizado, que se denominó pINOU2, se basó en el clonaje del gen *rnu2*, amplificado por PCR, en el vector pINIII OmpA2 (Ghrayeb et al., 1984) de forma que se conseguía la fusión del péptido señal de la OmpA y la RNasa U2. Se eligió esta estrategia porque era prácticamente idéntica a la empleada, con muy buenos resultados, para la producción de α -sarcina (Lacadena et al., 1994). El procedimiento seguido se muestra en la figura 52 y, esencialmente, consistió en introducir *rnu2* convenientemente

digerido con *MfeI* y *BglII*, entre los sitios compatibles *EcoRI* y *BamHI* de pINIIOmpAs. Esta construcción debía producir una proteína que se exportase al periplasma con tres aminoácidos más que la RNasa U2 en su extremo amino, concretamente Ala-Glu-Leu. En primera instancia no se intentó eliminar porque se pensó que el procesamiento postraduccional sería mejor así, que si el extremo amino fuera la cisteína original.

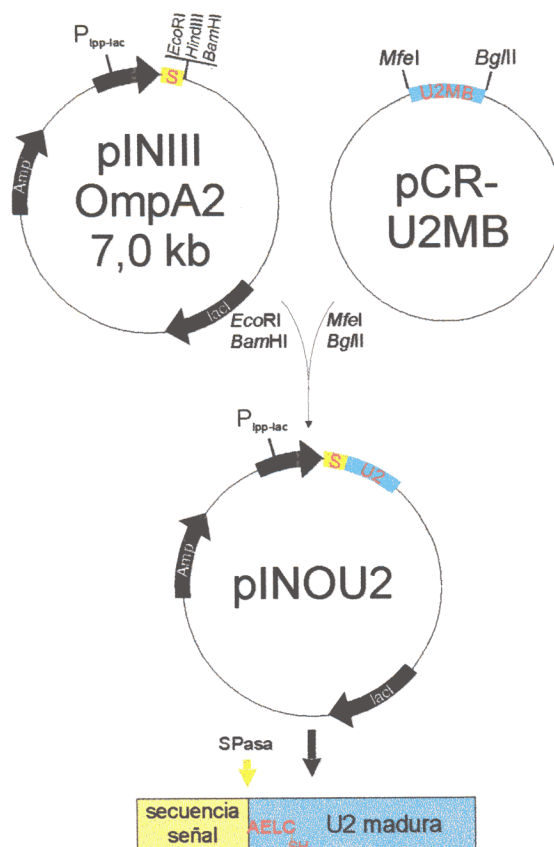


Figura 52: Esquema de la estrategia pINO2.

Una vez conseguido el plásmido pINO2, se transformaron las células de *E. coli* adecuadas para este sistema de producción, RB791, y se realizaron ensayos de producción piloto. Sin embargo, ni en el medio extracelular ni en las fracciones soluble o insoluble de los lisados celulares se apreciaron cantidades significativas (con respecto a los controles) de ninguna banda que pudiera corresponder a la RNasa U2. Sí se observó una gran abundancia de proteínas en los medios extracelulares de estos cultivos, con un patrón de bandas electroforéticas bastante parecido al de los lisados celulares. Esto no es habitual, sino que lo normal es que el medio extracelular aparezca prácticamente limpio de proteínas. Este resultado se mantuvo al cambiar de

células productoras, utilizándose la cepa JA221, por lo que no parece que fuera una característica de la cepa utilizada. Todo parecía indicar que la expresión de la RNasa U2 provocaba la lisis de células del cultivo, aunque no parecía que el crecimiento global del mismo se viera afectado. La interpretación más probable para estos resultados consiste en atribuir esta lisis celular a la acción citotóxica de la RNasa U2. Aquellas células que la produjesen, morirían y se lisarían. Esto, en cierta manera, provocaría que se seleccionaran las células no productoras y explicaría que no se detectara la RNasa U2 en el cultivo.

Secreción al medio extracelular (estrategia pINGU2)

Esta estrategia se desarrolló en colaboración con los Drs. Richard Kao y Julian Davies, de la *University of British Columbia*. Se basa en producir la RNasa U2 utilizando el mismo vector que para la producción de mitogilina y sus mutantes: el plásmido pING3552 (figura 53; Better et al., 1988 y 1992; Kao y Davies, 1995 y 1999; Kao et al., 1998).

En esta construcción, la expresión del gen se controla con el promotor del gen *araB* de *Salmonella typhimurium*, que está fuertemente regulado y se puede inducir por L-arabinosa. En el plásmido está también *araC*, un gen regulador de dicho promotor. Mediante PCR solapante de fragmentos, de forma similar a como se hizo para la producción de mutantes de mitogilina (Kao et al., 1998), se colocó la secuencia de la proteína madura a continuación de la secuencia señal del gen *pelB* de *Erwinia carotovora*, otra bacteria gram negativa. El plásmido incluye como selector el gen resistencia a tetraciclina.

Una vez construido el plásmido, se transformaron células competentes derivadas de la cepa W3110 (Better et al., 1992), suministradas por el laboratorio de Vancouver. Los ensayos de producción piloto demostraron que en este caso sí se obtenía la proteína madura y activa en el medio extracelular, si bien en muy baja cantidad. Como se aprecia en la figura 54, la cantidad de proteína producida es tan escasa que no se observó tras una tinción con azul de Coomassie del correspondiente gel, tras PAGE-SDS. Es necesario recurrir a la realización de un zimograma a pH 4,5 para detectar su presencia (figura 54C). Además, se observa la presencia de otras bandas, de mayor masa molecular que la RNasa U2, incluida la correspondiente a otra RNasa ácida constitutiva de *E. coli*. Este resultado sugiere que, aunque en menor medida, también puede tener lugar la muerte y lisis celular cuando se induce la expresión de la RNasa U2. En cualquier caso, a la vista de que al menos se podía medir su actividad, se decidió llevar a cabo una purificación a gran escala.

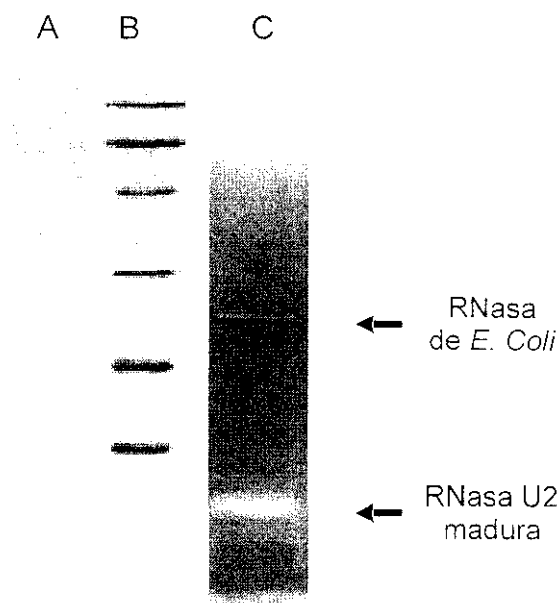


Figura 54: Electroforesis de una alícuota del medio extracelular de células de *E. coli* conteniendo pINGU2 tras 16 h de inducción con L-arabinosa. **A:** PAGE-SDS teñida con azul de Coomassie, en condiciones no reductoras, **B:** patrones preteñidos de masa molecular, **C:** zimograma de la misma muestra que en A.

Producción en *Escherichia coli*

Para purificar la RNasa U2 de *E. coli* se utilizó el plásmido pINGU2 con células W3110, según el protocolo que se describe en el correspondiente apartado de métodos. Resumiendo, se operó de la siguiente forma. Con esta cepa transformada por el plásmido, se cultivaron 2 l de medio, que se indujeron con L-arabinosa. Se separó el medio extracelular por centrifugación y se dializó. Este dializado se fraccionó mediante una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa a pH 6,0. Tras la elución, se recogieron las fracciones que presentaban actividad, tanto en el ensayo frente a RNA total, como en el zimograma.

El conjunto de fracciones activas recogidas del DEAE se concentró y se aplicó en la columna de penetrabilidad de Biogel P10. En esta columna se consigue separar la RNasa U2 de la RNasa de *E. coli*, pero el espectro de las fracciones recogidas indicaba que había otros contaminantes; entre ellos, otra proteína mayor. Para mejorar la purificación, se pasó la muestra por una columna de penetrabilidad («Superdex») en sistema FPLC. En el perfil obtenido tras esta columna, de mayor resolución, se observó un pico principal de absorbancia, que no coincidía exactamente con el pico de actividad. Asimismo, en la electroforesis de estas fracciones se observa que hay más de una banda, aunque es curioso que en las cromatografías de penetrabilidad, realizadas en dos soportes distintos, las dos proteínas coeluyan. En definitiva, no se lograba la purificación eficaz de la proteína, y el rendimiento obtenido no

fue demasiado bueno, por lo que se optó por intentar la producción de la proteína en otro sistema.

Estrategias de producción en *Pichia pastoris*

Para la producción de la proteína, se eligió en segundo lugar la levadura *Pichia pastoris*, pensando en que presentaría una serie de ventajas. Una primera, de carácter general, es que, al tratarse también de una proteína fúngica, el uso de un organismo más parecido podría ayudar a su mejor producción. Esto se concreta en que las rutas de secreción serán en principio más parecidas, por lo que el plegamiento de la RNasa U2 puede realizarse en un ambiente más parecido al que encuentra en el hongo original. Así, es previsible que se vea favorecida la correcta formación de los tres puentes disulfuro. Otra ventaja era la posibilidad de poder controlar el pH del medio de secreción donde se acumula la proteína, lo que es especialmente importante para evitar la formación de enlaces isoaspartato en la RNasa U2, como ya se ha comentado. Todas las estrategias abordadas suponían la producción extracelular de la proteína, para mimetizar la ruta de biosíntesis en el hongo y, además, evitar los indeseables efectos citotóxicos que tendría su producción intracelular.

Estrategia pPICU2

La primera estrategia que se planteó fue producir la RNasa U2 fusionada con la secuencia prepro del factor α de apareamiento de *S. cerevisiae*, utilizando para ello el plásmido pPIC9 de Invitrogen, construyendo un vector denominado pPICU2 (figura 55), mediante la ligación del gen *rnu2* flanqueado por los sitios de restricción *SalI* y *NotI*, en los respectivos sitios compatibles *XhoI* y *NotI* de pPIC9, con la precaución de colocar las secuencias de la RNasa U2 y el péptido líder en fase. Esta estrategia se había utilizado con éxito en nuestro propio laboratorio, en la producción del alergeno principal del polen de olivo, Ole e 1, obteniéndose un rendimiento de 60 mg/l (Huecas et al., 1999).

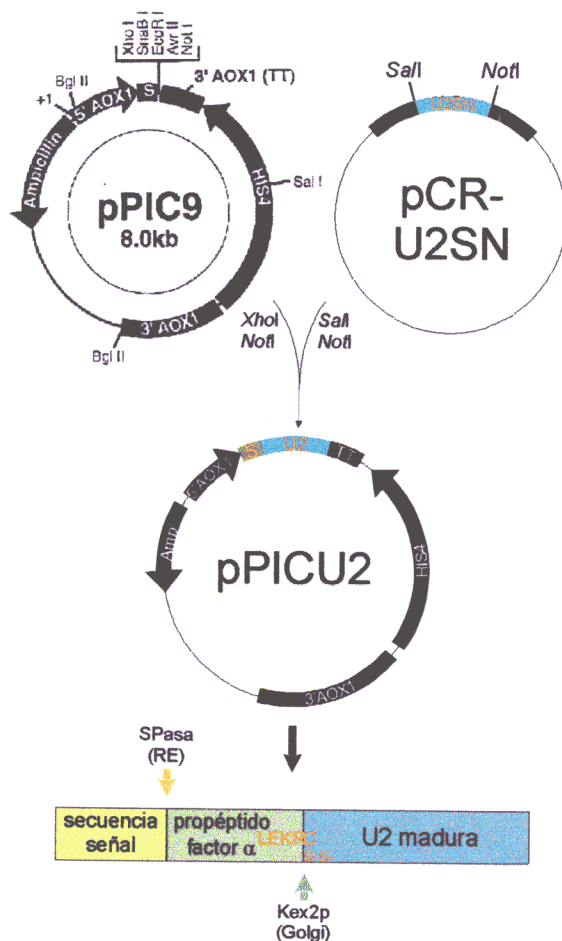


Figura 55: esquema de la estrategia pPICU2.

Tras construir el plásmido pPICU2 y verificar su secuencia, se digirió con *Bgl*III para obtener un fragmento lineal cuyos extremos solapasen con el gen *AOX1*. Con este fragmento se transformaron células GS115, y se seleccionaron aquellos transformantes que presentaban fenotipo *Mut^s*, con los que se llevaron a cabo experimentos de producción piloto, evaluando la producción de RNasa U2 en los caldos extracelulares mediante PAGE-SDS y zimograma. Si bien no se detectaba la proteína tiñendo con azul de Coomassie los geles de electroforesis, sí se observaron en varias de las cepas transformadas distintas bandas de actividad en el zimograma. Una de ellas correspondía con el tamaño esperado para la RNasa U2, pero también aparecían bandas de mayor tamaño (figura 56).

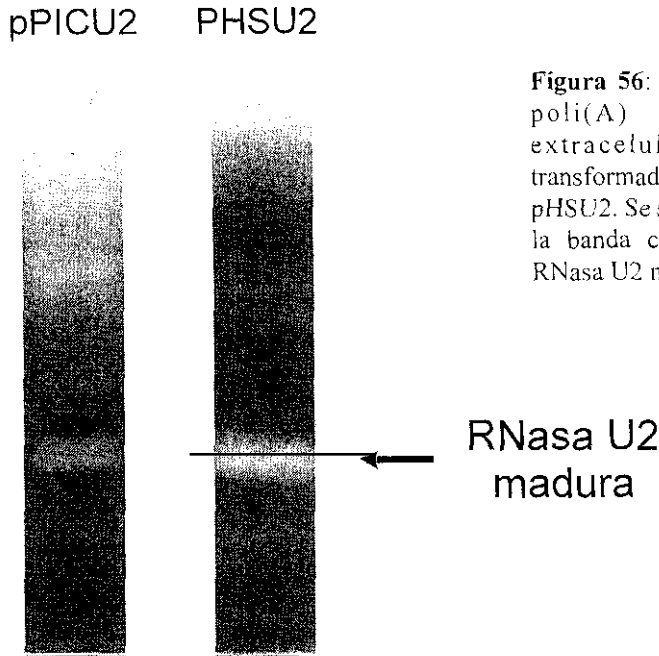


Figura 56: Zimograma frente a poli(A) de los medios extracelulares de cepas transformadas con pPICU2 o pHSU2. Se señala con una flecha la banda correspondiente a la RNasa U2 madura.

La presencia de estas bandas de menor movilidad electroforética se achacó a que en el extremo amino de la proteína madura hay una cisteína que forma parte de un puente disulfuro. Con el vector pPICU2, la célula debe producir un precursor que, tras cortársele la secuencia señal, se dirige a la ruta de secreción, donde es plegado y enviado al aparato de Golgi. Aquí actúan las proproteína convertasas (discutidas en profundidad anteriormente), que tendrían que cortar la secuencia pro tras los residuos -L-E-K-R-. Sin embargo, los resultados obtenidos sugerían que la presencia del puente disulfuro en la que está implicada la cisteína del extremo amino impedía el corte correcto, produciéndose, además de la RNasa U2 madura, especies mal procesadas, de mayor masa molecular (figura 56), o incluso agregados debidos a la incorrecta formación de puentes disulfuro intercatenarios. Esta estrategia, por tanto, se abandonó.

Estrategia pHSU2

A la vista de los resultados susodichos, se optó por utilizar el plásmido pHIL-S1 de Invitrogen, que también se había empleado con éxito para producir la α -sarcina (figura 57). En este caso se fusionaba la proteína madura al péptido señal de la fosfatasa alcalina de *P. pastoris*, incluido en el plásmido. De esta forma se pretendía evitar el problema de procesamiento que parece darse en pPIC9, ya que el péptido señal es cortado por la peptidasa señal cuando la

proteína se transloca al retículo endoplásmico y, por lo tanto, la proteína no se encuentra plegada y el puente disulfuro no se ha formado todavía. En la construcción usada hay tres aminoácidos, Arg-Glu-Leu, que hacen de espaciadores, resultantes de la estrategia necesaria para la yuxtaposición de los fragmentos de DNA, consistente en la ligación del gen *rnu2* flanqueado por los sitios de restricción *MfeI* y *BglII* en los sitios *EcoRI* y *BamHI* de pHIL-S1 (figura 57). El plásmido así obtenido se denominó pHSU2.

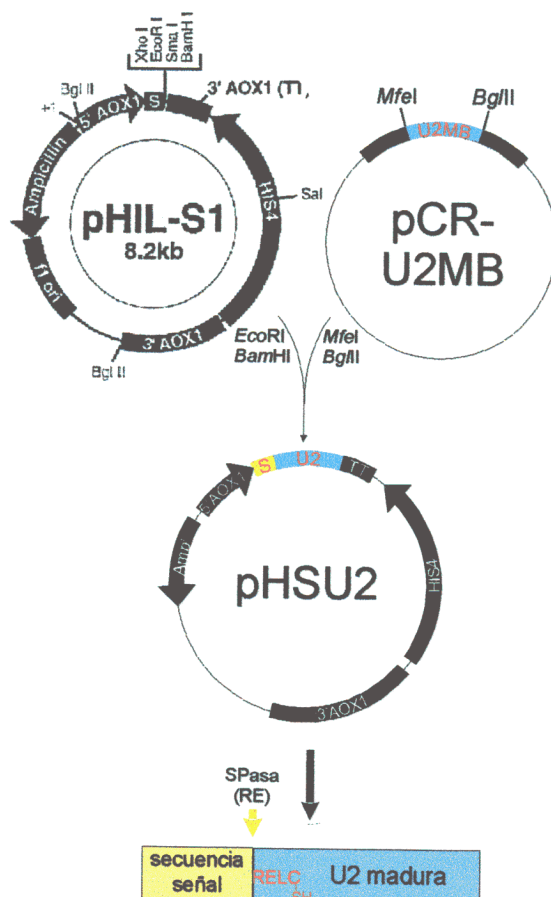


Figura 57: esquema de la estrategia pHSU2.

Con el fragmento lineal de pHSU2 cortado con *BglII* se transformaron células GS115, seleccionando una vez más los transformantes que presentaban fenotipo *Mut^s*. Con estos se llevaron a cabo experimentos de producción piloto, en los que se observó, al hacer el zimograma de los medios extracelulares, que se producía una única banda activa, correspondiente al tamaño esperado para la RNasa U2 (figura 56). Se seguía produciendo muy poca proteína, al igual que pasaba en *E. coli* pero, al no producirse lisis, el medio extracelular de *P.*

pastoris tenía pocas proteínas extracelulares y en baja concentración, como es habitual en los cultivos de esta levadura. Además, no se apreciaba, al contrario que en *E. coli*, la presencia de ninguna otra RNasa contaminante. Por eso, se decidió abordar su purificación.

Producción en *Pichia pastoris*

En este caso, para producir la RNasa U2 en este sistema eucariota, lo primero que se hizo fue seleccionar la cepa GS115 transformada con pHSU2 que produjera más RNasa U2. Dado que la transformación pasa por la integración genómica del DNA heterólogo (o, al menos, del gen *HIS4* usado para la selección), se producen transformantes muy distintos, porque el DNA heterólogo se integra de varias formas y en distintas posiciones, como ya se ha explicado en el apartado dedicado a la α -sarcina..

Para facilitar este proceso de selección, lo que se hizo fue desarrollar un método para ensayar fenotípicamente la producción de la proteína en múltiples cepas. Este consiste en inocular las cepas en MM con agar, un medio donde se incluye el metanol, que es el inductor del promotor utilizado para producir la proteína, conteniendo además RNA de levadura (al 2%) y azul de toluidina. El colorante tiñe de azul el RNA intacto pero, al secretar las cepas la RNasa, éste es digerido cambiando el colorante a una tonalidad roja, que se puede ver a simple vista o con un sencillo filtro azul. Este método facilita extraordinariamente la elección de la mejor cepa productora y es muy sencillo de aplicar en el caso de la RNasa U2, una ribonucleasa muy activa, poco específica y con un pH óptimo ácido.

Para completar la selección, con las cepas que más producían según el criterio anterior se hicieron ensayos de producción piloto en medio líquido, midiendo la cantidad de RNasa U2 mediante la cuantificación de la hidrólisis de RNA. Tras esta segunda selección, que ya se aplicó a un número menor de cepas productoras, se eligió aquella que más RNasa U2 secretaba al medio extracelular.

Producción en medio semimínimo

Se hizo una primera producción de RNasa U2 utilizando medio semimínimo (BMGY y BMMY), como se había hecho con la α -sarcina (véase el apartado correspondiente) y con Ole e 1 (Huecas et al., 1999). En este medio,

además de incluir los componentes de un medio mínimo (la mezcla llamada YNB, biotina, una fuente de carbono y otra de nitrógeno) y tampón fosfato a pH 6.0 (para controlar el pH del medio de producción), se añaden peptona y extracto de levadura, que ayudan a conseguir mayores densidades de células en el cultivo, y también ayudan a evitar la acción de proteasas extracelulares. Se trata, por tanto, de un medio relativamente rico y con el color «miel» característico de los caldos de cultivo que incluyen peptona, triptona o distintos extractos celulares. Se recalca este aspecto del color porque cuando se llevó a cabo la cromatografía de intercambio iónico que supone la primera etapa de la purificación, se detectó la presencia de contaminantes de tonalidad amarilla, no proteicos, cuyos valores de absorbancia, con máximos a 260 nm, distorsionaban todas las medidas. Además, estas sustancias, que estarían cargadas negativamente, interferían con la retención de la proteína en el soporte cromatográfico. Se intentó eliminarlas, mediante la utilización de carbón activo, pero no fue posible.

A la vista de que no se lograba purificar la RNasa U2 por la presencia de estos contaminantes, se optó por utilizar otro medio, mínimo e incoloro.

Producción en medio mínimo tamponado

Antes de realizar una purificación a gran escala, se ensayaron distintas condiciones, utilizando medio tamponado o no y variando la adición de metanol durante la fase de inducción, como se expuso en el apartado de métodos. Estas pruebas indicaron que se obtenía mayor actividad ribonucleolítica en medio tamponado y con adición de metanol dos veces al día, por lo que se utilizaron estas condiciones para purificar la proteína.

En estas purificaciones, los espectros del medio extracelular eran ya claramente, tras la diálisis, los de una fracción proteica, además de que no se observaba el mismo color amarillo intenso. Tras distintas pruebas de elución de la cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa, se decidió utilizar para la elución de la proteína en un gradiente de concentración salina, desde 0 a 0,5 M de NaCl. Las fracciones con actividad ribonucleolítica a pH ácido se concentraron y se volvieron a fraccionar mediante una cromatografía de penetrabilidad en una columna de Sephadex G-75.

Fermentación

Con la idea de aumentar el rendimiento en la producción de RNasa U2 con la misma cepa, se ensayó el cultivo en fermentación, en colaboración con los Drs. Humberto Martín y María Molina, del Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de esta Universidad.

Esta se llevó a cabo en un fermentador Biostat E, con una vasija de cristal y acero de 5,8 l de capacidad, y 4 l de medio de cultivo inicial. Se siguieron las directrices de Stratton et al. (1998), que son las que aconseja también la empresa Invitrogen. En la primera fase, el crecimiento del cultivo se realiza en el medio inicial, que contiene un 4% de glicerol, y se alcanzó una densidad celular (OD_{600}) de 52, con un peso húmedo de 65 g/l. Después se hizo una segunda fase de crecimiento por alimentación externa de glicerol al 50%, en la que se duplicó la masa celular (densidad óptica de 115, 130 g/l). Tras para la alimentación con glicerol, se dejó agotar este, hasta que subió el porcentaje de oxígeno disuelto. Entonces se inició la inducción de las células, lo que se hizo con un flujo constante de 0,2 ml/min de metanol, tal y como está recomendado en las citadas directrices, en las que se indica que de esta forma se compensa la pérdida de metanol que se produce, tanto por el pequeño consumo de las células con fenotipo Mut^s, como por evaporación.

Sin embargo, se observó que a partir del segundo día de inducción la masa celular empezó a disminuir. Hacia el final del cultivo se fue observando que aparecían células de menor tamaño y sin refringencia, y al centrifugar el cultivo aparecieron dos poblaciones de células: unas de color blanco y otras de color grisáceo, que sedimentaron antes en la centrifugación, y que no se reprodujeron apenas al sembrarlas en una placa de YPD. Por tanto, estábamos ante un caso de muerte celular, que podría deberse a dos causas: un exceso de metanol en el medio, que pudiera ser tóxico; o que la producción de la RNasa U2 fuera la causante de la citotoxicidad.

Se valoró la actividad ribonucleolítica a pH 4,5 de las alícuotas de la fase de inducción, observándose que la actividad iba aumentando, pero que permanecía siempre en niveles menores que en los cultivos en matraz. En colaboración con Nuria Peña y el Dr. Julio Reviejo, del Departamento de Química Analítica de esta Facultad, se valoró la concentración de metanol en las muestras, utilizando un biosensor que han desarrollado, y que utiliza precisamente la alcohol oxidasa de *P. pastoris*. Los resultados indicaron que, cuando la densidad del cultivo empezó a decrecer, la concentración de metanol en el cultivo ya era superior al 5%, y que se siguió acumulando el metano hasta llegar a niveles mayores del 20%. De hecho, la concentración de metanol en el

medio de cultivo era poco inferior a la correspondiente a la cantidad de metanol que se había añadido en cada tiempo, por lo que no se consumía prácticamente nada de metanol en el cultivo. Por tanto, esto es lo que había provocado la toxicidad para el cultivo, haciendo que no fuera viable y que, por tanto, no produjera cantidades significativas de RNasa U2.

En estos momentos se ha abordado un nuevo ensayo de fermentación, en el que se va a medir la concentración de metanol presente en el medio durante toda la fase de inducción, utilizando esos valores para ajustar dicha concentración al nivel de inducción deseado, entre 0,5 y 1%.

Purificación de la RNasa U2 natural de *Ustilago sphaerogena*

La RNasa U2 se descubrió y caracterizó a finales de los años 60 y al comienzo de los 70 (Arima et al., 1968a; Rushizky, 1970). Además, se conoce desde hace unos años su estructura tridimensional (Noguchi et al., 1995). Todo ello induce a pensar que se trata de una proteína bien caracterizada. Sin embargo, esto no es así. A pesar de ser pequeña y catalizar una reacción «sencilla», reúne toda una serie de peculiaridades, ya comentadas, que la convierten en una enzima muy singular. Muchas de estas peculiaridades no están bien explicadas o caracterizadas y otras, que se han observado durante la realización del trabajo presentado en esta Memoria, ni siquiera se comentan en las publicaciones correspondientes. Todo ello obligó a purificar RNasa U2 natural, a partir del hongo *U. sphaerogena*, para utilizarla como referencia. Especialmente en lo que respecta a su comportamiento electroforético y a su espectro de emisión de fluorescencia que, como se discute más adelante, son muy singulares.

Con el fin de llevar a cabo esta purificación, se obtuvo la cepa de *Ustilago sphaerogena* CBS 534.71, equivalente a la ATCC 12421, que se creció en PDA, observándose una morfología similar. Se realizaron pruebas de producción de la RNasa U2, valorándose la actividad a pH 4,5 frente a RNA total.

La purificación se realizó a partir de 3 l de MU, que se inocularon con un precultivo crecido en PDB, que se incubaron a 30 °C durante 100 h. Al cabo de este tiempo se recogieron los cultivos que crecían de forma «desagregada», que eran los que producían más actividad, descartándose un cultivo que crecía en forma de «estrellas» filamentosas. De estos cultivos se separó el medio extracelular, al que se sometió al mismo proceso de purificación que a la

RNasa U2 recombinante de *P. pastoris*. En las cromatografías se midió también la actividad ribonucleolítica a pH 7,5, pues en estas condiciones también se produce la RNasa U1, observándose que se separaba en la cromatografía de intercambio iónico, como se describió anteriormente (Arima et al., 1968a).

Caracterización de la proteínas nativa y recombinante

El análisis electroforético de las RNasas U2 obtenidas, tanto de *Ustilago sphaerogena* (natural) como de *Pichia pastoris* (recombinante), reveló que las proteínas eran homogéneamente puras, al menos en lo que respecta a la contaminación por componentes proteicos. Se compararon las movilidades electroforéticas de las proteínas obtenidas, reducidas y sin reducir, con las de los patrones de masa molecular (figuras 58 y 59). Eso permitió calcular unas masas moleculares de 9,5 kDa para la RNasa U2 nativa, y de 10,6 kDa para la recombinante, cuando no se han reducido. Al reducirlas con 2-mercaptoetanol, las movilidades corresponden a 24,0 kDa para la proteína nativa y 24,6 kDa para la recombinante.

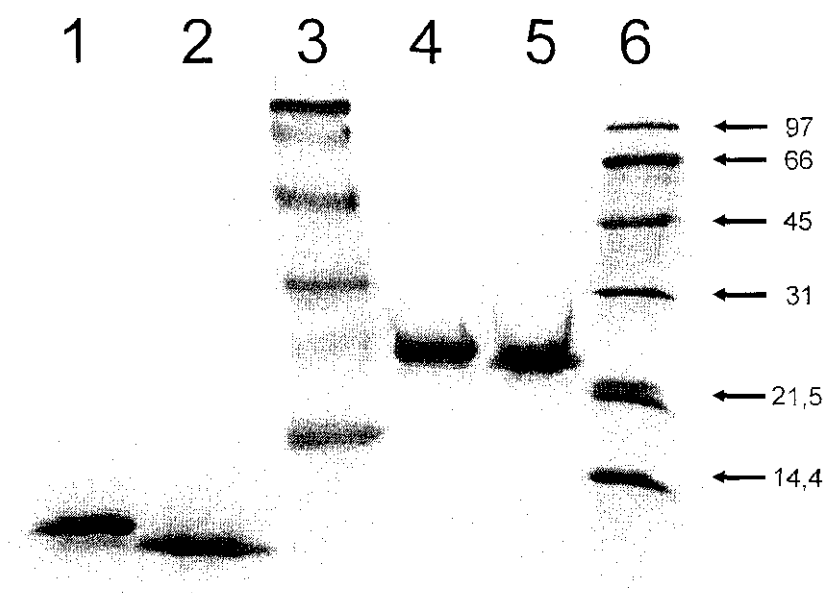


Figura 58: PAGE-SDS de RNasa U2 purificada de *U. sphaerogena* (2, 5) y de *P. pastoris* (1, 4), sin reducir (1, 2) y reducida con 2-mercaptoetanol (4, 5). 3: patrones de masa molecular preteñidos. 6: patrones de masa molecular (en kDa, a la derecha).

Ambas proteínas sin reducir migran bastante más que lo que correspondería a la masa molecular esperada (12,4 kDa en la proteína natural y 12,8 kDa en la recombinante), por lo que, aún en presencia de SDS, la proteína parece ser bastante compacta, no asimilable a la forma de varilla que adoptan la mayoría de las proteínas en presencia de SDS, lo que se explica por la presencia de los tres puentes disulfuro. Aun teniendo esto en cuenta, la diferencia entre ellas es bastante mayor que la que correspondería al aumento de masa molecular debido a los tres aminoácidos extra presentes en la proteína recombinante, lo que apuntaría a la existencia de conformaciones distintas.

Pero el hecho más destacado es la movilidad de las proteínas reducidas, que se comportan como dímeros, ajustándose mejor que los monómeros a la movilidad prevista (24,8 kDa para la natural, 25,6 kDa para la recombinante), por lo que estarían en una conformación más desplegada en presencia de SDS. Hay que descartar que la dimerización sea producto de un error experimental por no añadir suficiente agente reductor, ya que se ha probado tanto con 2-mercaptoetanol como con DTT, y siempre en condiciones saturantes e hirviendo las muestras, obteniendo los mismos resultados (figura 59). Esta dimerización producida por la reducción no se ha conseguido explicar, ni se han encontrado otros ejemplos en los que suceda. Ni siquiera se menciona este hecho en los trabajos anteriores sobre la RNasa U2.

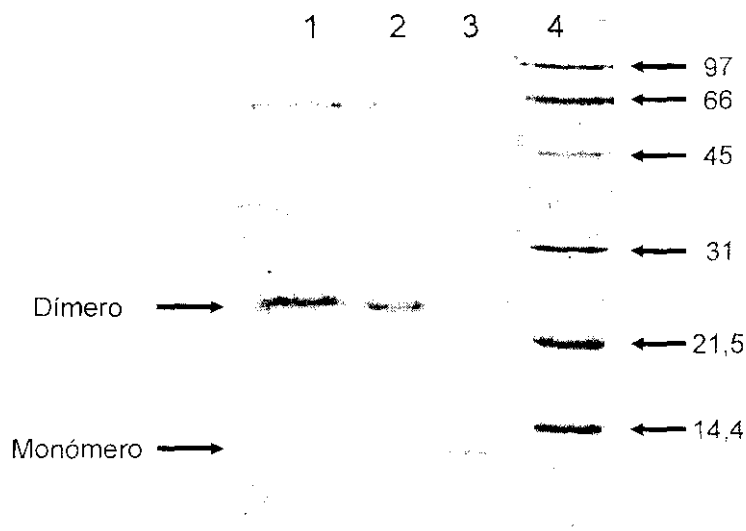


Figura 59: PAGE-SDS de RNasa U2 purificada de *P. pastoris*, tratada con distintos agentes reductores. 1: con mercaptoetanol al 5%. 2: con ditionitrosol al 0,2%. 3: sin agente reductor. 4: patrones de masa molecular (en kDa).

La pureza de las preparaciones se confirmó con zimogramas frente a poli(A), en los que aparecía una sola actividad ribonucleolítica en la proteína natural. En las preparaciones de la proteína recombinante se observó también la banda de actividad ribonucleolítica correspondiente, aunque en algunas de ellas se observó otra más, de menor actividad, que presentaba una movilidad electroforética similar a la de la RNasa U2 natural (figura 60).



Figura 60 Zimograma frente a poli(A) de RNasa U2 purificada de *U. sphaerogena* (1) y de *P. pastoris* (2). Se han aplicado 0,4 μ g de cada proteína.

El análisis de aminoácidos de la RNasa U2 natural y de la proteína recombinante (tabla 20) se ajusta razonablemente a lo esperado según sus secuencias, incluidos los tres aminoácidos extra de la proteína recombinante. Sin embargo, hay que destacar sobre todo las diferencias obtenidas en cuanto al contenido en algunos aminoácidos.

Si se observa la composición de aminoácidos de la RNasa U2 natural purificada (tabla 20) se ve que, en general, casi todos los residuos se ajustan razonablemente bien al valor esperado. Hay pequeñas diferencias que, en casi todos los casos, son atribuibles a las deficiencias propias del método. Por ejemplo, el contenido en Val e Ile es relativamente bajo, pero ya se sabe que el valor correspondiente a estos dos aminoácidos siempre se calcula por defecto si la hidrólisis ácida se lleva a cabo durante sólo 24 h. Sin embargo, es muy llamativo el contenido en Tyr, muy pequeño respecto al esperado. En nuestro laboratorio, la experiencia dice que la Tyr es un aminoácido que se calcula muy bien tras la hidrólisis ácida de las proteínas, salvo que haya tenido lugar algún proceso de oxidación fuerte o que no se haya alcanzado un vacío suficiente. También puede ocurrir, si no se añaden cantidades correctas de fenol a la mezcla de hidrólisis, que se clore el anillo aromático y, por tanto, se modifique el aminoácido. No parece que este sea el caso pues las hidrólisis se llevaron a

cabo simultáneamente con las de α -sarcina, como proteína patrón en este caso, y se obtuvieron valores correctos. Por otro lado, tampoco es atribuible a la presencia de una contaminación proteica ya que los valores de Met y Lys, dos aminoácidos ausentes en la RNasa U2, están de acuerdo con lo esperado.

Tabla 20: Análisis de aminoácidos de las RNasas U2 purificadas

Recombinante	Natural	Teórico ^a	Residuo
16,5	23,4	21	Asx
9,3	7,8	9	Thr
8,2	12,2	10	Ser
10,7	10,0	9*	Glx
7,2	7,1	8	Pro
10,7	11,3	11	Gly
7,6	6,8	7	Ala
4,9	4,8	6	Val
nd	nd	6	Cys
0,6	0,4	0	Met
4,5	3,7	5	Ile
5,0	3,0	3*	Leu
7,2	7,3	10	Tyr
3,0	2,4	3	Phe
nd	nd	1	Trp
2,2	2,8	2	His
0,5	0,5	0	Lys
3,7	2,7	3*	Arg

nd: no determinado

^a Número de residuos deducido de la secuencia primaria. En la proteína recombinante hay un residuo más de los marcados con asterisco.

Sobre la composición de la proteína recombinante (tabla 20) se puede decir lo mismo, y en los mismos términos, que lo discutido para la natural en el párrafo anterior. Todos los aminoácidos, en general, se ajustan a lo previsto salvo la Tyr, cuyo valor coincide con el calculado para la proteína natural. En este caso, también es muy baja, sin embargo, la cantidad de Asx. No se ha encontrado, por el momento, una explicación razonable que permita aclarar esta observación.

Se podrían explicar también las divergencias encontradas sería que sí hubiera impurezas en la preparación. Sin embargo, como ya se ha comentado, no se detecta ninguna otra proteína en la PAGE-SDS, ni en condiciones reductoras ni sin reducir (con el gran cambio de movilidad que conlleva en este caso), por lo que se podría decir que está pura en más de un 99%. Es poco probable que un componente proteico que no se detecta en la electroforesis esté presente en una cantidad suficiente como para distorsionar el resultado del análisis de aminoácidos. Otra explicación, más plausible, sería que hubiera

alguna impureza de tipo no proteico. Por ejemplo, algún componente nucleotídico que permanezca unido a la RNasa durante el proceso de purificación. De hecho, la hidrólisis ácida de nucleótidos rinde aminoácidos o, al menos, moléculas que se comportan como tales al ser fraccionadas en el analizador (Dr. Martínez del Pozo, comunicación personal).

En el espectro de absorción en el UV-visible se observa una sensible diferencia entre la RNasa U2 nativa y la recombinante (figura 61). Al calcular los coeficientes de extinción con los análisis de aminoácidos, se obtuvieron los valores de $0,97 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para la proteína recombinante, y de $2,20 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para la natural, en contraste con los publicados para la RNasa U2 natural, de $1,55 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Sato y Uchida, 1975d; Egami et al., 1980) y $1,84 \text{ l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Minato e Hirai, 1979). En el caso de la proteína natural, se podría considerar la existencia de otra banda de absorción añadida a la de la proteína, especialmente si se considera la absorción presente a más de 315 nm, donde la proteína no debería absorber. Quizá sea esta otra banda, no debida a componentes proteicos, la que propicie un coeficiente de extinción tan alto.

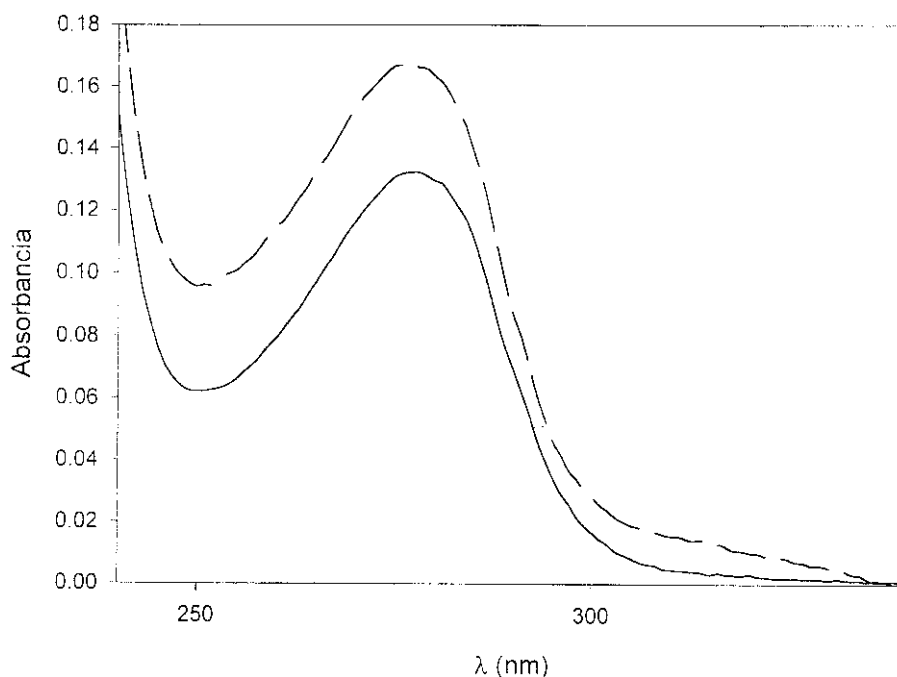


Figura 61: Espectros de absorción de RNasa U2 natural (línea discontinua) y recombinante (línea continua).

El espectro de dicroísmo circular (figura 62), sin embargo, es igual para ambas proteínas, tanto en el UV próximo como en el lejano, y similar al publicado anteriormente para la isoforma U2-A, en la que no se habría formado ningún enlace isoaspartato (Uchida y Shibata, 1981), lo que permite concluir que la estructura secundaria se mantiene en ambas proteínas, a pesar de que los resultados electroforéticos sugieran la existencia de variaciones conformacionales.

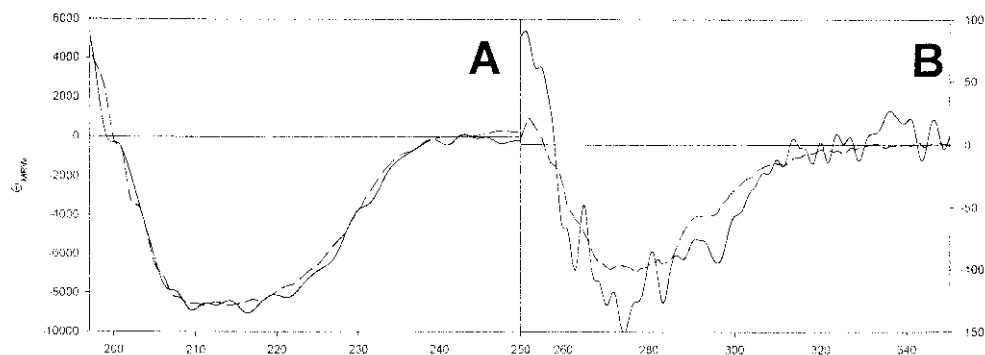


Figura 62: Espectros de CD en el UV lejano (A) y próximo (B) de RNasa U2 natural (línea continua) y recombinante (línea discontinua).

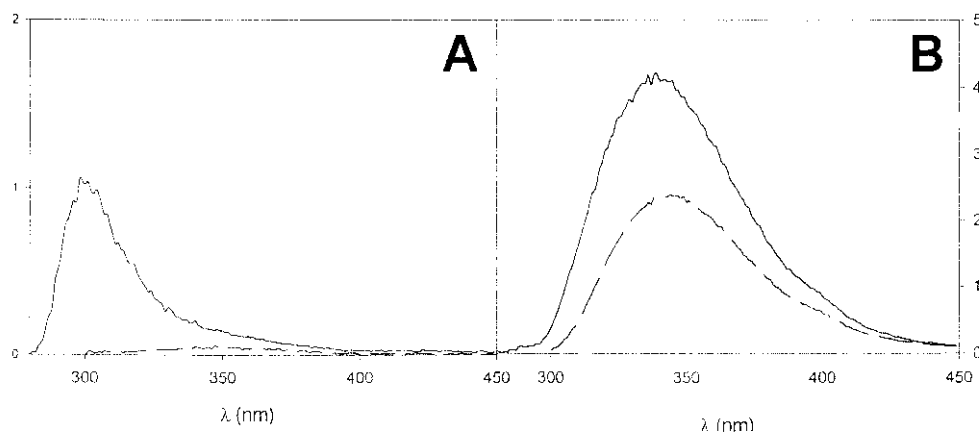


Figura 63: Espectros de emisión de fluorescencia de las RNasas U2 purificadas nativa (A) y recombinante (B), para excitación a 275 nm (línea continua) y 295 nm (línea discontinua). Las unidades de emisión son arbitrarias.

El espectro de emisión de fluorescencia, sin embargo, sí muestra una clara diferencia entre ambas proteínas (figura 63). Hay que recordar que la

RNasa U2 tiene un sólo residuo de triptófano y diez de tirosina. En la proteína natural, sólo se observa la emisión de fluorescencia típica de las tirosinas. Sin embargo, en la proteína recombinante, se observa un aumento de la emisión, claramente atribuible a una contribución de Trp. Esto es aún más evidente si se excita a 295 nm (figura 63). Por tanto, el Trp se encuentra desactivado en su emisión de fluorescencia en la proteína natural, lo que no sucede, al menos de forma tan intensa, en la proteína recombinante. El espectro de fluorescencia que hay publicado para la RNasa U2 natural presenta la misma desactivación de la fluorescencia del triptófano que la observada en este trabajo para la proteína natural (Minato e Hirai, 1979).

En cuanto a la actividad enzimática de ambas proteínas, los valores de la actividad específica obtenidos son bastante semejantes (tabla 21). La mayor actividad específica de la proteína recombinante puede ser un artefacto metodológico, puesto que no se han podido realizar simultáneamente ambas determinaciones. Asimismo, no se han comparado con los valores anteriormente publicados, puesto que dichos autores no utilizaban el mismo método que el aquí empleado, basado en la precipitación con acetato de uranilo (Dickman y Trupin, 1959; García Segura, 1985).

Tabla 21: Actividad específica frente a RNA y parámetros de la actividad enzimática frente a ApA de las RNasas U2 purificadas.

RNasa U2	Actividad específica (u.a. · l · g ⁻¹)	Actividad frente a ApA	
		K _M (μM)	k _{cat} (min ⁻¹)
Natural	7000	45 ± 8	27 ± 3
Recombinante	7600	200 ± 27	35 ± 4

Los parámetros de la reacción frente a ApA también son similares (tabla 21), y también en este caso no se puede descartar un cierto error metodológico, puesto que el número de puntos utilizado no ha sido el mismo en ambos casos. En estos momentos se está realizando en mejores condiciones dicho ensayo, para dar unos valores más fiables.

Una vez se disponga de esos datos, se podrá comprobar la utilidad del sistema de producción recombinante de la RNasa U2 en *P. pastoris*. Sin embargo, no es necesario disponer de esos datos para realizar una primera discusión sobre la conformación estructural de la proteína recombinante.

La proteína nativa y recombinante pueden tener distinto patrón de puentes disulfuro

La RNasa U2 nativa tiene tres puentes disulfuro, dos de los cuales están juntos, pues implican a los residuos Cys 54 y Cys 55 (Sato y Uchida, 1975c). Uno de ellos, el formado entre las Cys 55 y 96, está muy próximo espacialmente al Trp 60, según se deduce de la estructura tridimensional (figura 64). Así, este puente disulfuro podría ser el agente desactivante de la fluorescencia del Trp 60 en la proteína nativa. El otro puente se forma entre las Cys 1 y 54.

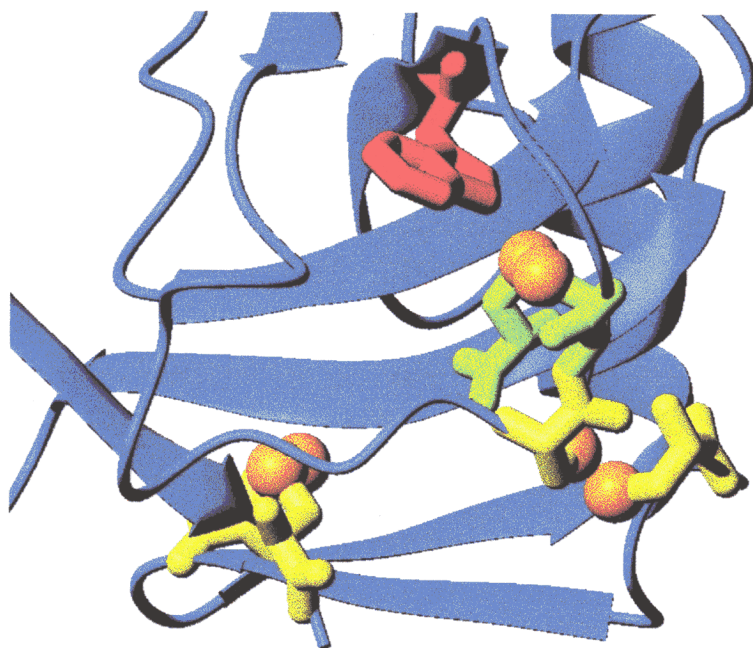


Figura 64: sobre la estructura en cinta de la RNasa U2 (en azul), obtenida del cristal de la isoforma U2-C (Noguchi et al., 1995; referencia 1rtu del PDB), se destaca el Trp 60 (en rojo) y los pares de cisteínas de los puentes disulfuro: en verde, el par 55-96, y en amarillo el 1-54 (a la derecha) y el 9-113. En naranja se destacan los átomos de azufre.

Sin embargo, esta desactivación no se da en la proteína recombinante, por lo que lo que puede suceder es que los puentes disulfuro estén mal formados. De hecho, la diferencia de secuencia entre las dos proteínas afecta precisamente al extremo amino, donde la recombinante tiene tres aminoácidos más. Al estar las dos Cys tan próximas, sería posible que se formaran dos puentes distintos manteniendo el mismo plegamiento global, lo que incluiría la misma estructura secundaria; por eso, los espectros de dicroísmo serían iguales, y la actividad de la proteína no se ve afectada en gran medida. Sin

embargo, esta reordenación local sí explicaría la falta de desactivación de la fluorescencia del Trp.

Asimismo, la diferencia en los puentes disulfuro explicaría la gran diferencia de movilidad electroforética que se observa en la electroforesis en condiciones desnaturalizantes y no reductoras que, como ya se dijo, es mayor que la mera diferencia de masa. De hecho, en algunos lotes de la proteína recombinante se puede apreciar una banda de movilidad electroforética parecida a la de la proteína nativa (figura 60). Esta banda se podría corresponder con una fracción de la proteína que tuviera los puentes disulfuro semejantes a los de la proteína nativa. De hecho, la cantidad de esta banda aumenta algo si se deja la proteína en el medio de cultivo, donde fácilmente pudiera haber una disulfuro isomerasa que ayudara a la reordenación de los puentes.

CONCLUSIONES

Se ha detectado por varios métodos la presencia de ribotoxinas no conocidas previamente en varias especies de hongos Ascomicetos: *Aspergillus viridinutans*, *A. fischeri*, *A. glaucus* y *Neosartorya glabra*, así como en algunas cepas de *A. giganteus*. Asimismo, se ha descartado su presencia en otras especies del género *Aspergillus* y de otros relacionados. De esta forma, se ha demostrado que las ribotoxinas están más extendidas entre los hongos filamentosos de lo que se creía hasta ahora.

Las ribotoxinas detectadas se han secuenciado parcialmente, comparándolas con las conocidas hasta entonces. Se destaca su gran similitud, lo que implica una gran conservación evolutiva, una vez que han adquirido los elementos que les dan su funcionalidad particular. El análisis de la variación estructural entre ellas ha permitido clasificarlas en distintos grupos. Estos grupos se corresponden en buena medida con los grupos taxonómicos definidos morfológicamente, excepto para el caso de las ribotoxinas de *Penicillium*, secuenciadas por otro grupo de investigación, que serían intermedias entre las ribotoxinas de distintas cepas de *A. giganteus*.

Mediante el alineamiento de su estructura primaria, se ha detectado la homología de la hirsutelina A, una proteína producida por un hongo entomopatógeno, *Hirsutella thompsonii*, con las ribonucleasas microbianas extracelulares de la superfamilia de la Rnasa T1. Se han podido establecer las similitudes y diferencias con las RNAsas no citotóxicas y con las ribotoxinas, situándose de forma intermedia entre ambos grupos. Así, se ha hipotetizado la posibilidad de que esta proteína sea un intermedio evolutivo, en el que estén presentes algunas de las propiedades de las ribotoxinas.

Se ha clonado y expresado el gen de la α -sarcina en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, produciéndose la proteína madura correctamente plegada y activa, tras optimizar el proceso de maduración postraduccional del precursor, aunque con un rendimiento que no supera actualmente a los sistemas de producción que se han conseguido en *Escherichia coli*. Este sistema puede ser utilizado para la producción de formas mutantes, especialmente aquellas que ofrezcan mayor dificultad en *E. coli*, como las que puedan implicar a los residuos de cisteína, por su papel en la formación de puentes disulfuro.

Se han purificado y caracterizado las dos formas extracelulares de otra proteína citotóxica producida por *Aspergillus giganteus*, la proteína antifúngica (AFP). Se ha podido determinar que la forma mayor (If-AFP) es un precursor de la forma madura, de menor actividad, y que evoluciona para dar la forma realmente antifúngica.

Además, de estos resultados se han obtenido varias conclusiones respecto al mecanismo de producción y secreción de estas toxinas, tanto en *Aspergillus* como en *Pichia*. Una de ellas es que la secuencia señal de secreción de la α -sarcina, propia de *A. giganteus*, es reconocida en *P. pastoris*. Por lo tanto, se dispone de un vector que podría ser utilizado para la secreción eficiente de otras proteínas en esta levadura, además de que permite pensar que esa secuencia señal podría ser reconocida en otros organismos.

Se ha demostrado que es precisamente el reconocimiento efectivo de la señal de secreción, y la inmediata translocación cotraduccional de la ribotoxina naciente al retículo endoplásmico, lo que permite al organismo productor, ya sea el original u otro heterólogo, la protección de los ribosomas propios frente a la acción de las toxinas.

Se ha establecido que el mecanismo de procesamiento proteolítico del precursor de α -sarcina se da en varios pasos a lo largo de la ruta de secreción: tras el corte de la secuencia señal, podría participar una dipeptidil aminopeptidasa; el corte de la secuencia pro remanente es realizado por una proproteína convertasa, lo que resulta en la proteína madura.

También se ha establecido el mecanismo de procesamiento de la AFP en *Aspergillus*, que utiliza pasos comunes con el de la α -sarcina: tras el corte por la peptidasa señal, actúa la misma proproteína convertasa, liberando al medio extracelular la If-AFP, precursora de la AFP, como ya se ha dicho.

La proproteína convertasa implicada en estos cortes no actúa de igual forma en *Aspergillus* que en *P. pastoris*, presentando diferente especificidad. Precisamente es este paso el que se ha optimizado en la producción de la α -sarcina en *P. pastoris*.

Se ha estudiado el mecanismo catalítico de la α -sarcina, demostrándose que es un mecanismo de tipo «ciclante», en el que están implicadas dos reacciones de transferencia de protones: una transfosforilación que rompe un enlace fosfodiéster para dar un producto con un grupo fosforilo unido de forma

cíclica a la ribosa, que es la reacción más rápida; y una hidrólisis de este producto cíclico.

Se ha estudiado la dependencia de esta actividad ribonucleolítica con el pH, estableciendo que la α -sarcina es una ribonucleasa ácida, con un pH óptimo de 5,0, lo que representa una similitud más con la RNasa U2, a diferencia de lo que se creía hasta ahora.

Se ha determinado el papel de los residuos que participan directamente en la reacción ácido-base de transfosforilación: la His 137 es el ácido general, mientras que el Glu 96 es la base general; la His 50 actúa como modulador, y no participa directamente en la cesión de protones.

Se ha clonado la secuencia codificante del gen de la RNasa U2, tanto del DNA genómico como del cDNA, detectándose la existencia de un intrón.

Se ha conseguido producir la RNasa U2 madura, de forma recombinante y mediante secreción al medio extracelular, tanto en *E. coli* como en *P. pastoris*, tras probar distintas estrategias, aunque con muy pequeño rendimiento.

Se han purificado y caracterizado tanto la RNasa U2 nativa de *Ustilago sphaerogena*, como la recombinante producida en *P. pastoris*. Aunque la proteína recombinante es activa y posee una estructura secundaria similar, presenta una variación conformacional, que puede ser debida a una diferencia en la formación de los puentes disulfuro, tal vez provocada por la presencia de tres aminoácidos extra en el extremo amino.

Por tanto, se dispone de sistemas que, con algunas mejoras que ya se plantean, permitirán la producción, no sólo de la RNasa U2, sino de formas mutantes en las que se incorporen los elementos que hay presentes en las ribotoxinas, colaborando a establecer así cuál es su papel en las propiedades características de estas proteínas tan evolucionadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Arima, T., Uchida, T. y Egami, F. (1968a) Studies on extracellular ribonucleases of *Ustilago sphaerogena*. Purification and properties. *Biochem. J.* **106**, 601-607.
- Arima, T., Uchida, T. y Egami, F. (1968b) Studies on extracellular ribonucleases of *Ustilago sphaerogena*. Characterization of substrate specificity with special reference to purine-specific ribonucleases. *Biochem. J.* **106**, 609-613.
- Arruda, L.K., Platts-Mills, T.A.E., Fox, J.W. y Chapman, M.D. (1990) *Aspergillus fumigatus* allergen I, a major IgE-binding protein, is a member of the mitogillin family of cytotoxins. *J. Exp. Med.* **172**, 1529-1532.
- Arruda, L.K., Mann, B.J. y Chapman, M.D. (1992a) Selective expression of a major allergen and cytotoxin, Asp f I in *Aspergillus fumigatus*. Implications for the immunopathogenesis of *Aspergillus*-related diseases. *J. Immunol.* **149**, 3354-3359.
- Arruda, L.K., Platts-Mills, T.A.E., Longbottom, J.L., El-Dahs, J.M. y Chapman, M.D. (1992b) *Aspergillus fumigatus* identification of 16, 18 and 45 kDa antigens recognized by human IgG and IgE antibodies and murine monoclonal antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**, 1166-1176.
- Arruda, L.K., Muir, A., Vailes, L.D., Selden, R.F., Platts-Mills, T.A.E. y Chapman, M.D. (1995) Antibody responses to *Aspergillus fumigatus* allergens in patients with cystic fibrosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **107**, 410-411.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Capel, M., Moore, P.B. y Steitz, T.A. (1999) Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* **400**, 841-847.
- Batanero, E., Villalba, M. y Rodríguez, R. (1994) Glycosilation site of the major allergen from olive tree pollen. Allergenic implications of the carbohydrate moiety. *Mol. Immunol.* **31**, 31-37.
- Bathurst, I.C., Brennas, S.O., Carrell, R.W., Cousens, L.S., Brake, A.J. y Barr, P.J. (1987) Yeast KEX2 protease has the properties of a human proalbumin converting enzyme. *Science* **235**, 348-350.
- Beauvais, A., Monod, M., Debeaupuis, J.P., Diauin, M., Kobayashi, H. y Latgé, J.P. (1997a) Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* **272**, 6238-6244.
- Beauvais, A., Monod, M., Wyniger, J., Debeaupuis, J.P., Grouzmann, E., Brakch, N., Svab, J., Hovanessian, A.G. y Latgé, J.P. (1997b) Dipeptidyl-peptidase IV secreted by *Aspergillus fumigatus*, a fungus pathogenic to humans. *Infect. Immun.* **65**, 3042-3047.
- Becker, D.M. y Guarente, L. (1991) High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol.* **194**, 182-187.

- Beintema, J.J., Breukelman, H.J., Carsana, A. y Furia, A. (1997) Evolution of vertebrate ribonucleases: ribonuclease A superfamily. En *Ribonucleases: structures and functions*. D'Alessio, G. y Riordan, J.F., eds. Academic Press, pp. 245-269.
- Benner, S.A., Ciglic, M.I., Haugg, M., Jermann, T.M., Opitz, J.G., Raillard-Yoon, S.-A., Soucek, J., Stackhouse, J., Trabesinger-Rüf, N., Trautwein, K. y Zankel, T.R. (1997) Evolutionary reconstruction in the ribonuclease family. En *Ribonucleases: structures and functions*. D'Alessio, G. y Riordan, J.F., eds. Academic Press. pp. 213-243.
- Benyon, R.J. y Bond, J.S. (1989) Proteolytic enzymes: a practical approach. IRL Press, Oxford, p. 231.
- Better, M., Chang, C.P., Rohnia, R.R. y Horwitz, A.H. (1988) *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment. *Science* **240**, 1041-1043.
- Better, M., Bernhard, S.L., Lei, S.P., Fishwild, D. y Carrol, S.F. (1992) Activity of recombinant mitogillin and mitogillin immunoconjugates. *J. Biol. Chem.* **267**, 16712-16718.
- Bitter, G.A., Chen, K.K., Banks, A.R. y Lai, P.-H. (1984) Secretion of foreign proteins from *Saccharomyces cerevisiae* directed by α -factor gene fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5330-5334.
- Bezborodova, S.I., Khovoda, O.M., Stepanov, V.M. (1983) The complete amino acid sequence of ribonuclease C2 from *A. clavatus*. *FEBS Lett.* **159**, 256-258.
- Blackburn, P., Wilson, G. y Moore, S. (1977) Ribonuclease inhibitor from human placenta. *J. Biol. Chem.* **252**, 5904-5910.
- Blandin, P., Mérola, F., Brochon, J.C., Trémeau, O. y Ménez, A. (1994) Dynamics of the active loop of snake toxins as probed by time-resolved polarized tryptophan fluorescence. *Biochemistry* **33**, 2610-2619.
- Blank, A. y Dekker, C.A. (1972a) Ribonuclease U₄ from *Ustilago sphaerogena*. Purification and physiscal properties. *Biochemistry* **11**, 3956-3962.
- Blank, A. y Dekker, C.A. (1972b) Ribonuclease U₄. Novel phosphotransferases catalyzing exonucleolytic degradation of ribonucleic acid. *Biochemistry* **11**, 3962-3970.
- Blank, A. y Dekker, C.A. (1975) Differential activity staining: its use in characterization of guanylyl-specific ribonuclease in the genus *Ustilago*. *Proc. Natl. Acad. USA* **72**, 4914-4917.
- Blank, A., Sugiyama, R.H. y Dekker, C.A. (1982) Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: use of aqueous isopropanol to remove detergent from gels. *Anal. Biochem.* **120**, 267-275.
- Bloch, C. y Richardson, J.S. (1991) A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect alpha-amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) have sequence homologies with wheat gamma-purothionins. *FEBS Lett.* **279**, 101-104.

- Böhlman, H. y Apel, K. (1991) Thionins. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 227-240.
- Boon, T. (1972) Inactivation of ribosomes in vitro by colicin E3 and its mechanism of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 549-552.
- Boman, H.G. y Hultmark, D. (1987) Cell-free immunity in insects. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 103-126.
- Boman, H.G., Boman, I.A., Andreu, D., Li, Z., Merrifield, R.B., Schlenstedt, G. y Zimmermann, R. (1989) Chemical synthesis and enzymic processing of precursor forms of cecropins A and B. *J. Biol. Chem.* **264**, 5852-5860.
- Bostian, K.A., Elliot, Q., Bussey, H., Burn, V., Smith, A. y Tipper, D.J. (1984) Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell* **36**, 741-751.
- Boucias, D.G., Farmerie, W.G. y Penland, J.C. (1998) Cloning and sequencing of cDNA of the insecticidal toxin hirsutellin A. *J. Invertebr. Pathol.* **72**, 258-261.
- Bowman, C.M., Sidikaro, J. y Nomura, M. (1971) Specific inactivation of ribosomes by colicin E3 in vitro and mechanism of immunity in colicogenic cells. *Nature New Biol.* **234**, 133-137.
- Brake, A.J., Merryweather, J.P., Coit, D.G., Heberlein, U.A., Masiarz, F.R., Mulenbach, G.T., Urdea, M.S., Valenzuela, P. y Barr, P.J. (1984) α -factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4642-4646.
- Brandhorst, T. y Kenealy, W.R. (1992) Production and localization of restrictocin in *Aspergillus restrictus*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1429-1435.
- Brandhorst, T., Yang, R. y Kenealy, W.R. (1994) Heterologous expression of the cytotoxin restrictocin in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*. *Protein Exp. Purif.* **5**, 486-497.
- Bravo, J., Fernández, E., Ribó, M., De Llorens, R. y Cuchillo, C.M. (1994) A versatile negative-staining ribonuclease zymogram. *Anal. Biochem.* **219**, 82-86.
- Brigotti, M., Rambelli, F., Zamboni, M., Montanaro, L. y Sperti, S. (1989) Effect of α -sarcin and ribosome inactivating proteins on the interaction of elongation factors with ribosomes. *Biochem. J.* **257**, 723-727.
- Bruix, M., Jiménez, M.A., Santoro, J., González, C., Colilla, F.J., Méndez, E. y Rico, M. (1993) Solution structure of gamma I-H and gamma I-P thionins from barley and wheat endosperm determined by ^1H -NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry* **32**, 715-724.

- Campbell, M.K. y Ts'o, O.P. (1971) Binding of purine nucleoside monophosphates by ribonuclease T1. A model system for protein nucleic acid interaction. *Biochim. Biophys. Acta* **232**, 427-435.
- Campos Olivas, R. (1997) Estructura y dinámica de proteínas por resonancia magnética nuclear: proteína antifúngica y alfa-sarcina. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Gavilanes, J.G. y Rico, M. (1995a) NMR solution structure of the antifungal protein from *Aspergillus giganteus*: evidence for cysteine pairing isomerism. *Biochemistry* **34**, 3009-3021.
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Gavilanes, J.G. y Rico, M. (1995b) Base de datos *Protein Data Bank*, nº acceso 1AFP.
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Martínez del Pozo, Á., Lacadena, J., Gavilanes, J.G. y Rico, M. (1996a) ¹H and ¹⁵N nuclear magnetic resonance assignment and secondary structure of the cytotoxic ribonuclease α -sarcin. *Protein Sci.* **5**, 962-972.
- Campos-Olivas, R., Bruix, M., Santoro, J., Martínez del Pozo, Á., Lacadena, J., Gavilanes, J.G. y Rico, M. (1996b) Structural basis for the catalytic mechanism and substrate specificity of the ribonuclease α -sarcin. *FEBS Lett.* **399**, 163-165.
- Cann, J.R. (1972) Circular dichroism of intramolecularly hydrogen-bonded acetylamino acid amides. *Biochemistry* **11**, 2654-2659.
- Carrasco, L. y Esteban, M. (1982) Modification of membrane permeability in vaccinia virus-infected cells. *Virology* **117**, 62-64.
- Chan, Y.L., Endo, Y. y Wool, I.G. (1983) The sequence of the nucleotide at the α -sarcin cleavage site in 28S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **21**, 12768-12770.
- Chance, R.E., Ellis, R.M. y Bromer, W.W. (1968) Porcine proinsulin: characterization and amino acid sequence. *Science* **161**, 165-167.
- Chrétien, M. y Li, C.H. (1967) Isolation, purification and characterization of lipotropic hormone from sheep pituitary glands. *Can. J. Biochem.* **45**, 1163-1174.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Ciglic, M.I., Jackson, P.J., Raillard, S.A., Haugg, M., Jermann, T.M., Opitz, J.G., Trabesinger-Rüf, N. y Benner, S.A. (1998) Origin of dimeric structure in the ribonuclease superfamily. *Biochemistry* **37**, 4008-4022.
- Clare, J.J., Rayment, F.B., Ballantine, S.P., Sreekrishna, K. y Romanos, M.A. (1991a) High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology* **9**, 455-460.

Clare, J.J., Romanos, M.A., Rayment, F.B., Rowedder, J.B., Smith, M.A., Payne, M.M., Sreekrishna, K. y Hendwood, C.A. (1991b) Production of mouse epidermal growth in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* **105**, 205-212.

Conde, F.P., Fernández-Puentes, C., Montero, M.T.V. y Vázquez, D. (1978) Protein toxins that catalytically inactivate ribosomes from eukaryotic microorganisms. Studies of the mode of action of alpha-sarcin, mitogillin and restrictocin: response to alpha sarcin antibodies. *FEMS Microbiol. Lett.* **4**, 349-355.

Conde, F.P., Orlandi, R., Canevari, S., Mezzanzanica, D., Ripamonti, M., Muñoz, S.M., Jorge, P. y Colnaghi, M.I. (1989) The *Aspergillus* toxin restrictocin is a suitable cytotoxic agent for generation of immunoconjugates with monoclonal antibodies directed against human carcinoma cells. *Eur. J. Biochem.* **178**, 795-802.

Connor, J., Bucana, C., Fiedler, I.J. y Schiort, A.J. (1989) Differentiation-dependent expression of phosphatidylserine in mammalian plasma membranes: quantitative assessment of outer-leaflet lipid by prothrombinase complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3184-3188.

Contreras, R., Carrez, D., Kinghorn, J.R., Van den Hondel, C.A.M.J.J. y Fiers, W. (1991) Efficient KEX2-like processing of a glucoamylase-interleukin-6 fusion protein by *Aspergillus nidulans* and secretion of mature interleukin-6. *Bio/Technology* **9**, 378-381.

Correl, C.C., Munishkin, A., Chan, Y.L., Ren, Z., Wool, I.G. y Steitz, T.A. (1998) Crystal structure of the ribosomal RNA domain essential for binding elongation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 13436-13441.

Correll, C.C., Wool, I.G. y Munishkin, A. (1999) The two faces of the *Escherichia coli* 23 S rRNA sarcin/ricin domain: the structure at 1.11 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **292**, 275-287.

Couderec, R. y Baratti, J. (1980) Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 2279-2289.

Cregg, R., Barringer, K.J., Hessler, A.Y. y Madden, K.R. (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3376-3385.

Cregg, J.M., Tschopp, J.F., Stillman, C., Sigel, R., Akong, M., Craig, W.S., Buckholz, R.G., Madden, K.R., Kellaris, P.A., Davis, G.R., Smiley, B.R., Cruze, J., Torregrossa, R., Velicelebi, G. y Thill, G.P. (1987) High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **5**, 479-485.

Cregg, J.M. y Madden, K.R. (1988) Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Dev. Ind. Microbiol.* **29**, 33-41.

Cregg, J.M., Vedvick, T.S. y Raschke, W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign proteins in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **11**, 905-910.

Cuadras, M.A., Arias, C.F. y López, S. (1997) Rotaviruses induce an early membrane permeabilization of MA104 cells and do not require a low intracellular Ca^{2+} concentration to initiate their replication cycle. *J. Virol.* **71**, 9065-9074.

Cuchillo, C.M., Parés, X., Basman, T., Travers, F. y Nogués, M.V. (1993) The role of 2',3'-cyclic phosphodiesterases in the bovine pancreatic ribonuclease A catalysed cleavage of RNA: intermediates or products?. *FEBS Lett.* **3**, 207-210.

Cuchillo, C.M., Vilanova, M. y Nogués, M.V. (1997) Pancreatic ribonucleases. En *Ribonucleases: structures and functions*. D'Alessio, G. y Riordan, J.F., eds. Academic Press, pp. 271-304.

D'Alessio, G., Di Donato, A., Parente, A. y Piccoli, R. (1991) Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 104-106.

Day, L.A. (1973) Circular dichroism and ultraviolet absorption of a deoxyribonucleic acid binding protein of filamentous bacteriophage. *Biochemistry* **12**, 5329-5339.

De los Ríos Benítez, V.M. (1999) Caracterización y mecanismo de acción de sticholisina II. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

De los Ríos, V., Oñaderra, M., Martínez-Ruiz, A., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Martínez del Pozo, Á. y Gavilanes, J.G. (2000) Overproduction in *Escherichia coli* and purification of the hemolytic protein sticholysin II from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Protein Expr. Purif.* (en prensa).

delCardayré, S.B., Ribó, M., Yokel, E.M., Quirk, D.J., Rutter, W.J. y Raines, R.T. (1995) Engineering ribonuclease A: production, purification and characterization of wild-type enzyme and mutants at Gln11. *Protein Engng.* **8**, 261-273.

Devaux, P.F. (1993) Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes and in lipid bilayers. *Curr. Op. Struct. Biol.* **3**, 489-494.

Devaux, P.F. y Zachowski, A. (1994) Maintenance and consequences of membrane phospholipid asymmetry. *Chem. Phys. Lipids* **73**, 107-120.

Dickman, S.R. y Trupin, K.M. (1959) Ribonuclease assay based on uridine phosphate determination. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 355-361.

Digan, M.E., Lair, S.V., Brierley, R.A., Siegel, R.S., Williams, M.E., Ellis, S.B., Kellarism, P.A., Provow, S.A., Craig, W.S., Velicelebi, G., Harpold, M. y Thill, G.P. (1989) Continuous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **7**, 160-164.

Ding, J.P., Koellner, G., Grunert, H.P. y Saenger, W. (1991) Three-dimensional structure of ribonuclease T1 complexed with adenosine 2'-phosphate at 1.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **266**, 15128-15134.

- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. y Mattick, J.S. (1991) "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gen amplification. *Nucl. Acids Res.* **19**, 4008.
- Egami, F., Oshima, T. y Uchida, T. (1980) Specific interaction of base-specific nucleases with nucleosides and nucleotides. En *Molecular biology, biochemistry and biophysics*. Chapeville, F. y Haenni, A.-L., eds. Springer Verlag, vol. 32, pp. 250-277.
- Egel-Mitani, M. y Hansen, M.T. (1987) Nucleotide sequence of the gene encoding the *Saccharomyces kluyveri* alpha mating pheromone. *Nucl. Acids Res.* **15**, 6303.
- Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M. y Gingeras, T.R. (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1316-1323.
- Endo, Y. y Wool, I.G. (1982) The site of action of α -sarcin on eukaryotic ribosomes: the sequence at the α -sarcin cleavage-site in 28S ribosomal ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **257**, 9054-9060.
- Endo, Y., Hubert, P.W. y Wool, I.G. (1983) The ribonuclease activity of the cytotoxin α -sarcin: The characteristics of the enzymatic activity of α -sarcin with ribosomes and ribonucleic acids as substrates. *J. Biol. Chem.* **258**, 2662-2667.
- Endo, Y., Mitsui, M., Motizuki, M. y Tsurugi, K. (1987) The mechanism of action of ricin and related toxin lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol. Chem.* **262**, 5908-5912.
- Endo, Y. y Tsurugi, K. (1988) The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. *J. Biol. Chem.* **263**, 8735-8739.
- Endo, Y., Glück, A., Chan, Y.-L., Tsurugi, K. y Wool, I.G. (1990) RNA-protein interaction: an analysis with RNA oligonucleotides of the recognition by α -sarcin of a ribosomal domain critical for function. *J. Biol. Chem.* **265**, 2216-2222.
- Endo, Y., Glück, A. y Wool, I.G. (1991) Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. *J. Mol. Biol.* **221**, 193-207.
- Endo, Y., Oka, T. y Natori, Y. (1993a) The biosynthesis of a cytotoxic protein, α -sarcin, in a mold *Aspergillus giganteus*. I. Synthesis of prepro- and pro- α -sarcin *in vitro*. *Tokushima J. Exp. Med.* **40**, 1-6.
- Endo, Y., Oka, T., Natori, Y. y Yokota, S. (1993b) The biosynthesis of a cytotoxic protein, α -sarcin, in a mold *Aspergillus giganteus*. II. Maturation of precursor form of α -sarcin *in vivo*. *Tokushima J. Exp. Med.* **40**, 7-12.
- Fabre, E., Nicaud, J.M., López, M.C. y Gaillardin, C. (1991) Role of the proregion in the production and secretion of the *Yarrowia lipolytica* alkaline extracellular protease. *J. Biol. Chem.* **266**, 3782-3790.

- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. y Henson, P.M. (1992a) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **148**, 2207-2216.
- Fadok, V.A., Savill, J.S., Haslett, C., Bratton, D.L., Doherty, D.A., Campbell, P.A. y Henson, P.M. (1992b) Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J. Immunol.* **149**, 4029-4035.
- Fando, J.L., Alaba, I., Escarmis, C., Fernández-Luna, J.L., Méndez, E. y Salinas, M. (1985) The mode of action of restrictocin and mitogillin on eukaryotic ribosomes. *Eur. J. Biochem.* **149**, 29-34.
- Fernández-Luna, J.L., López Otín, C., Soriano, F. y Méndez, E. (1985) Complete amino acid sequence of the *Aspergillus* cytotoxin mitogillin. *Biochemistry* **24**, 861-867.
- Fernández-Puentes, C. y Carrasco, L. (1980) Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins. *Cell* **20**, 769-775.
- Fernández-Puentes, C. y Vázquez, D. (1977) Effects of some proteins that inactivate the eukaryotic ribosome. *FEBS Lett.* **78**, 143-146.
- Fersht, A. (1998) Structure and mechanism in protein science. W.H. Freeman and Co., Nueva York.
- Findlay, D., Herries, D.G., Mathias, A.P., Rabin, B.R. y Ross, C.A. (1961) The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. *Nature* **190**, 781-785.
- Freskgard, P.O., Martensson, I.G., Jonasson, P., Jonsson, B.H. y Carlsson, U. (1994) Assignment of the contribution of the tryptophan residues to the circular dichroism spectrum of human carbonic anhydrase II. *Biochemistry* **33**, 14281-14288.
- Fujii, G., Selsted, M.E. y Eisenberg, D. (1993) Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci.* **2**, 1301-1312.
- Fuller, R.S., Sterne, R.E. y Thorner, J. (1988) Enzymes required for yeast prohormone processing. *Annu. Rev. Physiol.* **50**, 345-362.
- Furutani, M., Kashiwagi, K., Ito, K., Endo, Y. e Igarashi, K. (1992) Comparison of the modes of action of a Vero toxin (a Shiga-like toxin) from *Escherichia coli*, of ricin, and of α -sarcin. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 140-146.
- Ganz, T., Selsted, M.E. y Lehrer, R.I. (1990) Defensins. *Eur. J. Haematol.* **44**, 1-8.
- García, M.L., García-Calvo, M., Hidalgo, P., Lee, A. y MacKinnon, R. (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* **33**, 6834-6839.

García-Ortega, L., Lacadena, J., Lacadena, V., Masip, M., De Antonio, C., Martínez-Ruiz, A. y Martínez del Pozo, Á. (2000) The solubility of the ribotoxin α -sarcin, produced as a recombinant protein in *Escherichia coli*, is significantly increased in the presence of thioredoxin. *Lett. Applied Microbiol.*, en prensa.

García Segura, J.M. (1985) Actividades degradantes de RNA del insecto *Ceratitidis capitata*. Tesis doctoral, Univesidad Complutense de Madrid.

Gasset Vega, M. (1990) Bases moleculares de la citotoxicidad de la proteína antitumoral α -sarcina. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.

Gasset, M., Martínez del Pozo, Á., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1989) Study of the interaction between the antitumour protein α -sarcin and phospholipid vesicles. *Biochem. J.* **258**, 569-575.

Gasset, M., Oñaderra, M., Thomas, P.G. y Gavilanes, J.G. (1990) Fusion of phospholipid vesicles produced by the anti-tumour protein α -sarcin. *Biochem. J.* **265**, 815-822.

Gasset, M., Oñaderra, M., Martínez del Pozo, Á., Schiavo, G-P., Laynez, J., Usobiaga, P. y Gavilanes, J.G. (1991a) Effect of the antitumour protein α -sarcin on the thermotropic behaviour of acid phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1068**, 9-16.

Gasset, M., Oñaderra, M., Goormaghtigh, E. y Gavilanes, J.G. (1991b) Acid phospholipid vesicles produce conformational changes on the antitumor protein α -sarcin. *Biochim. Biophys. Acta* **1080**, 51-58.

Gasset, M., Mancheño, J.M., Lacadena, J., Turnay, J., Olmo, N., Lizarbe, M.A., Martínez del Pozo, Á., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1994) α -Sarcin, a ribosome-inactivating protein that translocates across the membrane of phospholipid vesicles. *Current Topics in Peptide and Protein Research* **1**, 99-104.

Gasset, M., Mancheño, J.M., Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1995a) Spectroscopical characterization of the alkylated α -sarcin cytotoxin. Analysis of the structural requirements for the protein-lipid bilayer hydrophobic interaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1252**, 43-52.

Gasset, M., Mancheño, J.M., Laynez, J., Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1995b) Thermal unfolding of the cytotoxin α -sarcin. Phospholipid binding induces destabilization of the protein structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1252**, 126-134.

Gavilanes, J.G., Vázquez, D., Soriano, F. y Méndez, E. (1983) Chemical and spectroscopic evidence on the homology of three antitumor proteins: α -sarcin, mitogillin and restrictocin. *J. Protein. Chem.* **2**, 251-261.

Ghrayeb, J., Kimura, H., Takahara, M., Hsiung, H., Masui, Y. e Inouye, M. (1984) Secretion cloning vectors in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **3**, 2437-2442.

Gietz, R.D. y Schiestl, R.H. (1995) Transforming yeast with DNA. *Methods Mol. Cell. Biol.* **5**, 255-269.

- Glitz, D.G. y Dekker, C.A. (1964a) *Biochemistry* **3**, 1391.
- Glitz, D.G. y Dekker, C.A. (1964b) *Biochemistry* **3**, 1399.
- Glück, A., Endo, Y. y Wool, I.G. (1992) Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. Analysis with tetraloop mutants. *J. Mol. Biol.* **226**, 411-424.
- Glück, A., Endo, Y. y Wool, I.G. (1994) The ribosomal RNA identity elements for ricin and for α -sarcin: mutations in the putative CG pair that closes a GAGA tetraloop. *Nucl. Acids Res.* **22**, 321-324.
- Glück, A. y Wool, I.G. (1996) Determination of the 28S ribosomal RNA identity element (G4319) for alpha-sarcin and the relationship of recognition to the selection of the catalytic site. *J. Mol. Biol.* **256**, 838-848.
- Gohda, K., Oka, K., Tomita, K. y Hakoshima, T. (1994) Crystal structure of RNase T1 complexed with the product nucleotide 3'-GMP. Structural evidence for direct interaction of histidine 40 and glutamic acid 58 with the 2'-hydroxyl group of the ribose. *J. Biol. Chem.* **269**, 17531-17536.
- Goldin, A., Serpick, A.A. y Mantel, N. (1966) Experimental screening procedures and clinical predictability value. *Cancer Chemotherapy Reports* **50**, 173-218.
- Grauzin, J., Land, R.P.O., Grunert, H. y Heinemann, U. (1992) RNase T1 mutant Glu46Gln binds the inhibitors 2'-GMP and 2'-AMP at the 3' subsite. *J. Mol. Biol.* **225**, 533-542.
- Grunert, H.P., Zouni, A., Beineke, M., Quaas, R., Georgalis, Y., Saenger, W. y Hahn, U. (1991) Studies on RNase T1 mutants affecting enzyme catalysis. *Eur. J. Biochem.* **197**, 203-207.
- Guarna, MM, Lesnicki, GJ, Tam, BM, Robinson, J, Radziminski, C.Z., Hasenwinkle, D., Boraston, A., Jervis, E., MacGillivray, R.T.A., Turner, R.F.B. y Kilburn, D.G. (1997) On-line monitoring and control of methanol concentration in shake-flask cultures of *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 279-286.
- Guex, N. y Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- Guisez, Y., Tison, B., Vandekerckhove, J., De Molder, J., Bauw, G., Fiers, W. y Contreras, R. (1991) Production and purification of recombinant human interleukin-6 secreted by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **23**, 217-222.
- Gutell, R.R. y Fox, G.E. (1988) A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format. *Nucl. Acids Res.* **16**, 175-269.
- Habermann, E. (1972) Bee and wasp venoms. *Science* **177**, 314-318.

- Hahn, U. y Heinemann, U. (1994) Structure determination, modeling and site-directed mutagenesis studies. En *Concepts in protein engineering and design*. Wrede, P. y Schneider, G., eds. De Gruyter, pp. 109-168.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hansen, J.E., Lund, O., Tolstrup, N., Gooley, A.A., Williams, K.L. y Brunak, S. (1998) NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility. *Glycoconj. J.*, **15**, 115-130.
- Hartley, R.W. (1988) Barnase and barstar. Expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease. *J. Mol. Biol.* **202**, 913-915.
- Hartley, R.W. (1989) Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 450-454.
- Hartley, R.W., Both, V., Hebert, E.J., Homerova, D., Jucovic, M., Nazarov, V., Rybajlak, I. y Sevcik, J. (1996) Barstar inhibits extracellular ribonuclease of *Streptomyces* and allows their production from recombinant genes. *Protein Pept. Lett.* **3**, 225-231.
- Hartley, R.W. (1997) Barnase and barstar. En *Ribonucleases: structures and functions*. D'Alessio, G. y Riordan, J.F., eds. Academic Press, pp. 51-100.
- Heinemann, U., Wernitz, M., Pähler, A., Saenger, W., Menke, G. y Rüterjans, H. (1980) Crystallization of a complex between ribonuclease T1 and guanylic acid. *Eur. J. Biochem.* **109**, 109-114.
- Heinemann, U. y Saenger, W. (1982) Specific protein-nucleic acid recognition in ribonuclease T1-2'-guanylic acid complex an X-ray study. *Nature (London)* **299**, 27-31.
- Henze, P.P.C., Hahn, U., Erdmann, V.A. y Ulbrich, N. (1990) Expression of the chemically synthesized coding region for the cytotoxin α -sarcin in *Escherichia coli* using a secretion cloning vector. *Eur. J. Biochem.* **192**, 127-131.
- Herrera, L., Yong, V., Margolles, E., Delgado, J., Morales, J., Silva, A., Paifer, E., Ferbeyre, G., Sosa, A., Martínez, V., Aguiar, J., Seralena, A., González, T., Montesino, R., Cremata, J.A., Villareal, A. y González, B. (1991) Method for the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*, expression vectors and transformed microorganisms. Patente EP0438200.
- Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E. y Dreyer, W. (1981) A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.* **256**, 7990.
- Higgins, D.R. y Cregg, J.M., eds. (1998) *Pichia* protocols. *Methods Mol. Biol.*, vol. 103. Humana Press, Totowa (Nueva Jersey).
- Hill, C., Dodson, G., Heinemann, U., Saenger, W., Mitsui, Y., Nakamura, K., Borisov, S., Tischenko, G., Polyakov, K. y Pavlovsky, S. (1983) The structural and sequence homology of a family of microbial ribonucleases. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 1-6.

- Hobden, A.N. y Cundliffe, E. (1978) The mode of action of alpha sarcin and a novel assay of the puromycin reaction. *Biochem. J.* **170**, 57-61.
- Hoffman, C.S. y Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Hofsteenge, J. (1997) Ribonuclease inhibitor. En *Ribonucleases: structures and functions*. D'Alessio, G. y Riordan, J.F., eds. Academic Press, pp. 621-658.
- Holden, D.W., Tang, C.M. y Smith, J.M. (1994) Molecular genetics of *Aspergillus* pathogenicity. *Antonie van Leeuwenhoek* **65**, 251-255.
- Homerova, D., Hollanderova, Z., Kormanec, J. y Sevcik, J. (1992) Cloning and sequencing of the gene encoding a ribonuclease from *Streptomyces aureofaciens* CCM3239. *Gene* **119**, 147-148.
- Hsi, K.-L., Chen, L., Hawkw, D.H., Zieske, L.R. y Yuan, P.-M. (1991) A general approach for characterizing glycosylation sites of glycoproteins. *Anal. Biochem.* **198**, 238-245.
- Huang, K.-C., Hwang, Y.-Y., Hwu, L. y Lin, A. (1997) Characterization of a new ribotoxin gene (c-sar) from *Aspergillus clavatus*. *Toxicon* **35**, 383-392.
- Huecas, S., Villalba, M., González, E., Martínez-Ruiz, A. y Rodríguez, R. (1999) Production and characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Eur. J. Biochem.* **261**, 539-545.
- Ikegaya, K., Hirose, M., Ohmura, T. y Nkihara, K. (1997) Complete determination of disulfide forms of purified recombinant human serum albumin, secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Anal. Chem.* **69**, 1986-1991.
- Inagaki, F., Kawano, Y., Shimada, I., Takahashi, K. y Miyazawa, T. (1981) Nuclear magnetic resonance study on the microenvironments of histidine residues of ribonuclease T1 and carboxymethylated ribonuclease T1. *J. Biochem.* **89**, 1185-1195.
- Innis, M.A., Holland, M.J., McCabe, P.C., Cole, G.F., Wittman, V.P., Tal, R., Watt, K.W.K., Gelfand, D.H., Holland, J.P. y Meade, J.H. (1985) Expression, glycosilation and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **228**, 21-26.
- Irie, M. (1997). RNase T₁/RNase T₂ family RNases. En *Ribonucleases: structures and functions*. D'Alessio, G. y Riordan, J.F., eds. Academic Press. pp. 101-130.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. y Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
- Jaton-Orgay, K., Suter, M., Cramer, R., Falchetto, R., Fatih, A. y Monod, M. (1992) Nucleotide sequence of a genomic and a cDNA clone encoding an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **92**, 163-168.

- Jones, E.W. (1991) Three proteolytic systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**, 7963-7966.
- Julius, D., Blair, L., Brake, A., Sprague, G. y Thorner, J. (1983) Yeast α -factor is processed from a larger precursor polypeptide: the essential role of a membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase. *Cell* **32**, 839-852.
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R. y Thorner, J. (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine endopeptidase required for processing of yeast prepro- α -factor. *Cell* **37**, 1075-1089.
- Kanaya, S. y Uchida, T. (1986) Comparison of the primary structures of ribonuclease U₂ isoforms. *Biochem. J.* **240**, 163-170.
- Kanaya, S. y Uchida, T. (1995) Revised sequence of ribonuclease U₂ in the substrate-binding region. *J. Biochem.* **118**, 681-682.
- Kao, R. y Davies, J. (1995) Fungal ribotoxins: a family of naturally engineered targeted toxins? *Biochem. Cell Biol.* **73**, 1151-1159.
- Kao, R., Shea, J.E., Davies, J. y Holden, D.W. (1998) Probing the active site of mitogillin, a fungal ribotoxin. *Mol. Microbiol.* **29**, 1019-1027.
- Kao, R. y Davies, J. (1999) Molecular dissection of mitogillin reveals that the fungal ribotoxins are a family of naturally engineered ribonucleases. *J. Biol. Chem.* **274**, 12576-12582.
- Koike, T., Uchida, T. y Egami, F. (1971) Synthesis of adenylyl-(3',5')-nucleosides, adenylyl-(3',5')-guanosine 2',3'-cyclic phosphate, and oligoadenylic acids by ribonuclease U₂. *Biochem.* **69**, 111-117.
- Kreil, G. (1990) Processing of precursors by dipeptidylaminopeptidases: a case of molecular ticketing. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 23-26.
- Kukuruzinska, M.A., Bergh, M.L., Em, L. y Jackson, B.J. (1987) Protein glycosylation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 915-944.
- Kunkel, T.A., Roberts, J.D. y Zakour, R.A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**, 367-382.
- Kurjan, J. y Herskowitz, I. (1982) Structure of a yeast pheromone gene (*MFa*): a putative α -factor precursor contains four tandem repeats of mature α -factor. *Cell* **30**, 933-943.
- Kurup, V.P., Kuman, A., Kenealy, W.R. y Greenberger, P.A. (1994) *Aspergillus* ribotoxins react with IgE and IgG antibodies of patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Lab. Clin. Med.* **123**, 749-756.

- Kurup, V.P., Banerjee, B., Murali, P.S., Greenberger, P.A., Krishnan, M., Hari, V. y Fink, J.N. (1998) Immunodominant peptide epitopes of allergen *Aspf I* from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Peptides* **19**, 1469-1477.
- Lacadena García-Gallo, F.J. (1997) Purificación y caracterización de diferentes formas mutantes de la citotoxina alfa-sarcina. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Barbero, J.L., Mancheño, J.M., Gasset, M., Oñaderra, M., López-Otín, C., Ortega, S., García, J.L. y Gavilanes, J.G. (1994) Overproduction and purification of biologically active native fungal α -sarcin in *Escherichia coli*. *Gene* **142**, 147-151.
- Lacadena, J., Mancheño, J.M., Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, Á., Gasset, M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1995a) Substitution of histidine-137 by glutamine abolishes the catalytic activity of the ribosome-inactivating protein α -sarcin. *Biochem. J.* **309**, 581-586.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Gasset, M., Patiño, B., Campos-Olivas, R., Vázquez, C., Martínez-Ruiz, A., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1995b) Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **324**, 273-281.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Lacadena, V., Martínez-Ruiz, A., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1998) The cytotoxin α -sarcin behaves as a cyclizing ribonuclease. *FEBS Lett.* **424**, 46-48.
- Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Martínez-Ruiz, A., Pérez-Cañadillas, J.M., Bruix, M., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1999) Role of histidine-50, glutamic acid-96 and histidine-137 in the ribonucleolytic mechanism of the ribotoxin α -sarcin. *Proteins* **37**, 474-484.
- Lamy, B. y Davies, J. (1991) Isolation and nucleotide sequence of the *Aspergillus restrictus* gene coding for the ribonucleolytic toxin restrictocin and its expression in *Aspergillus nidulans*: the leader sequence protects producing strains from suicide. *Nucl. Acids Res.* **19**, 1001-1006.
- Lamy, B., Moutaouakil, M., Latgé, J.P. y Davies, J. (1991) Secretion of a potential virulence factor, a fungal ribonucleotoxin, during human aspergillosis infections. *Mol. Microbiol.* **5**, 1811-1815.
- Lamy, B., Davies, J. y Schindler, D. (1992) The *Aspergillus* ribonucleolytic toxins (ribotoxins) En *Genetically engineered toxins*, Frankel, A.E., ed. Marcel Dekker, pp. 237-258.
- Latgé, J.-P. (1999) *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 310-350.
- Leibowitz, M.J. y Wickner, R.W. (1976) A chromosomal gene required for killer plasmid expression, mating and sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. USA* **73**, 2061-2065.

- Lee, W., Moore, C.H., Watt, D.D. y Krishna, N.R. (1994) Solution structure of the variant-3 neurotoxin from *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Eur. J. Biochem.* **219**, 89-95.
- Lee, D.G., Shin, S.Y., Maeng, C.-Y., Jin, Z.Z., Kim, K.L. y Hahn, K.-S. (1999) Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **263**, 646-651.
- Lidholm, D.-A., Gudmundsson, G.H., Xanthopoulos, K.G. y Boman, H.G. (1987) *FEBS Lett.* **226**, 8-12.
- Lin, A., Huang, K.-C., Hwu, L., Tzean, S.S. (1995) Production of type II ribotoxins by *Aspergillus* species and related fungi in Taiwan. *Toxicon* **33**, 105-110.
- Lin, A., Ciou-Jau, C., Tzean, S.S. (1997) Bases de datos EMBL/GenBank/DBJ, números de acceso AF01281-AF012817.
- Liprandi, F., Moros, Z., Gerder, M., Ludert, J.E., Pujol, F.H., Ruiz, M.C., Michelangeli, F., Charpilienne, A., Cohen, J. (1997) Productive penetration of rotavirus in cultured cells induces coentry of the translation inhibitor alpha-sarcin. *Virology* **237**, 430-438.
- Liu, J.-C., Boucias, D.G., Pendland, J.C., Liu, W.-Z. y Maruniak, J. (1996) The mode of action of hirsutellin A on eukaryotic cells. *J. Invertebr. Pathol.* **67**, 224-228.
- López Otín, C., Barber, D., Fernández Luna, J.L., Soriano, F. y Méndez, E. (1984) The primary structure of the cytotoxin restrictocin. *Eur. J. Biochem.* **149**, 621-634.
- Lord, J.M., Roberts, L.M. y Robertus, J.D. (1994) Ricin: structure, mode of action, and some current applications. *FASEB J.* **8**, 201-208.
- Loverix, S., Laus, G., Martins, J.C. y Steyaert, J. (1998) Reconsidering the energetics of ribonuclease catalysed RNA hydrolysis. *Eur. J. Biochem.* **257**, 286-290.
- MacFayden, D.A. (1934) The nuclease activity of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **107**, 297-308.
- Mancheño Gómez, J.M. (1995) Estudio del mecanismo de acción de la citotoxina α -sarcina. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1994a) Molecular interactions involved in the passage of the cytotoxic protein α -sarcin across membranes. En *Structure, Biogenesis and Dynamics of Biological Membranes*. Op den Kamp, J.A.F., ed. Springer Verlag, Berlín, Heidelberg, pp. 269-276.
- Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Ramón, F., Martínez del Pozo, Á., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1994b) Kinetic study of the aggregation and lipid-mixing produced by α -sarcin on phosphatidylglycerol and phosphatidylserine vesicles: stopped-flow light-scattering and fluorescence energy transfer measurements. *Biophys. J.* **67**, 1117-1125.

Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1995a) Predictive study of the conformation of the cytotoxic protein α -sarcin: a structural model to explain α -sarcin-membrane interaction. *J. Theor. Biol.* **172**, 259-267.

Mancheño, J.M., Gasset, M., Albar, J.P., Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1995b) Membrane interaction of a β -structure-forming synthetic peptide comprising the 116-139th sequence of the cytotoxic protein α -sarcin. *Biophysical J.* **68**, 2387-2395.

Mancheño, J.M., Martínez del Pozo, Á., Albar, J.P., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1998a) A peptide of nine amino acid residues from α -sarcin cytotoxin is a membrane-perturbing structure. *J. Peptide Res.* **51**, 142-148.

Mancheño Gómez, J.M., Oñaderra Sánchez, M., Gasset Vega, M., Martínez del Pozo, Á., Lacadena García-Gallo, J. y Gavilanes Franco, J.G. (1998b) Aggregation and lipid-mixing of dimyristoylphosphatidylserine vesicles induced by the cytotoxin α -sarcin. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. (Esp)* **92**, 185-193.

Manning, M.C. y Woody, R.W. (1989) Theoretical study of the contribution of aromatic side chains to the circular dichroism of basic bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* **28**, 8609-8613.

Martínez del Pozo, Á., Gasset, M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1988) Conformational study of the antitumor protein α -sarcin. *Biochim. Biophys. Acta* **953**, 280-288.

Martínez del Pozo, Á., Gasset, M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1989) Effect of divalent cations on structure-function relationships of the antitumour protein α -sarcin. *Int. J. Peptide Res.* **33**, 406-412.

Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, Á., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1997) Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1340**, 81-87.

Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, Á., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., López-Otín, C. y Gavilanes, J.G. (1998) Secretion of recombinant pro- and mature fungal α -sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys-Arg motif is required for maturation. *Protein Expr. Purif.* **12**, 315-322.

Martínez-Ruiz, A., Kao, R., Davies, J. y Martínez del Pozo, Á. (1999a) Ribotoxins are a more widespread group of proteins within the filamentous fungi than previously believed. *Toxicon* **37**, 1549-1563.

Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, Á., Lacadena, J., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1999b) Hirsutellin A displays significant homology to microbial extracellular ribonucleases. *J. Invertebr. Pathol.* **74**, 96-97.

Marx, F., Haas, H., Reindl, M., Stöffler, G., Lottspeich, F. y Redl, B. (1995) Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* *paf* gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene* **167**, 167-171.

- Matoba, S. y Ogrydziak, D.M. (1989) A novel location for dipeptidyl aminopeptidase processing sites in the alkaline extracellular protease of *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem* **264**, 6037-6043.
- Matsuyama, K. y Natori, S. (1990) Mode of action of sapecin, a novel antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J. Biochem.* **108**, 128-132.
- Matsuzaki, T., Sasaki, C., Okumura, C. y Uchida, T. (1989) The X-ray analysis of ribonuclease U₂. En *Proceedings of the first international meeting on structure and chemistry of ribonucleases*. Pavlovsky, A. y Polyakov, K., eds. Academia de Ciencias de la URSS, Moscú, pp. 286-290.
- McDonald, J.K. y Schwabe, C. (1977) En *Proteinases in mammalian cells and tissues*. Barrett, A.J., ed. North-Holland Publishing Company, pp. 311-391.
- McNutt, M., Mullins, L.S., Raushel, F.M. y Pace, C.N. (1990) Contribution of histidine residues to the conformational stability of ribonuclease T1 and mutant Glu-58-Ala. *Biochemistry* **29**, 7572-7576.
- Mentlein, R., Dahms, P., Grandt, D. y Krüger, R. (1993) Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl aminopeptidase IV. *Regul. Peptides* **49**, 133-144.
- Merola, M., Martínez del Pozo, A., Ueno, H., Recsei, P., DiDonato, A., Manning, J.M., Tanizawa, K., Mosu, Y., Asano, S., Tanaka, H., Soda, K., Ringe, D. y Petsko, G.A. (1989) Site-directed mutagenesis of the cysteinyl residues and the active site serine residue of bacterial D-amino acid transaminase. *Biochemistry* **28**, 505-509.
- Messing, J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol.* **101**, 70-79.
- Miller, S.P. y Bodley, J.W. (1988) The ribosomes of *Aspergillus giganteus* are sensitive to the cytotoxic action of α -sarcin. *FEBS Lett.* **229**, 388-390.
- Minato, S. e Hirai, A. (1979) Characterization of *Ustilago* ribonuclease U₂. Effects of chemical modification at glutamic acid-61 and cystine-1 and of organic solvents on the enzymatic activity. *J. Biochem.* **85**, 327-344.
- Mizuno, K., Nakamura, T., Ohshima, T., Tanaka, S. y Matsuo, H. (1988) Yeast KEX2 genes encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine proteases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **156**, 246-254.
- Moazed, D., Robertson, J.M. y Noller, H.F. (1988) Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. *Nature* **334**, 362-364.
- Moser, M., Cramer, R., Menz, G., Schneider, T., Dudler, T., Virchow, C., Gmachl, M., Blasch, K. y Suter, M. (1992) Cloning and expression of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I/a (rAsp f I/a) with IgE binding and type I skin test activity. *J. Immunology* **149**, 454-460.

- Moutaouakil, M., Monod, M., Prévost, M.C., Bouchara, J.P., Paris, S. y Latgé, J.P. (1993) Identification of the 33-kDa alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* in vitro and in vivo. *J. Med. Microbiol.* **39**, 393-399.
- Muñoz, A., Castrillo, J.L. y Carrasco, L. (1985) Modification of membranes permeability during Senliki Forest Virus infection. *Virology* **146**, 203-212.
- Nadano, D., Yasuda, T., Sawazaki, K., Takeshita, H. y Kishi, K. (1993) Activity measurements and multiplicity detection of human secretory-type ribonuclease based on polycytidylic acid/ethidium bromide fluorescence. *Anal. Biochem.* **212**, 111-116.
- Nadano, D., Yasuda, T., Takeshita, H. y Kishi, K. (1995) Activity staining of mammalian ribonuclease inhibitors after electrophoresis in scaled vertical slab polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **227**, 210-215.
- Nakaya, K., Omata, K., Okahashi, I., Nakamura, Y., Kolkenbrock, H. y Ulbrich, N. (1990) Amino acid sequence and disulfide bridges of an antifungal protein isolated from *Aspergillus giganteus*. *Eur. J. Biochem.* **19**, 31-38.
- Nakamura, K.T., Iwahashi, K., Yamamoto, Y., Iitaka, Y., Yoshida, N. y Mitsui, Y. (1982) Crystal structure of a microbial ribonuclease, RNase St. *Nature* **299**, 564-566.
- Neurath, H. (1989) Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends. Biochem. Sci.* **14**, 268-271.
- Nicolaizik, W.H., Moser, M., Cramer, R., Little, S., Warner, J.O., Blaser, K. y Schöni, M.H. (1995) Identification of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis patients by recombinant *Aspergillus fumigatus* IgA-specific serology. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**, 634-639.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. y von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1-6.
- Nishikawa, S., Morioka, H., Kim, H.-J., Fuchimura, K., Tanaka, T., Uesugi, S., Hakoshima, T., Tomita, K.-I., Ohtsuka, E. y Ikehara, M. (1987) Two histidine residues are essential for ribonuclease T₁ activity as is the case of ribonuclease A. *Biochemistry* **26**, 8620-8624.
- Noda, N., Noguchi, S. y Satow, Y. (1997) Crystal structures of nucleic acid complexes of ribonuclease U₂. *Nucl. Acids Symp. Series* **37**, 285-286.
- Noguchi, S., Satow, Y., Uchida, T., Sasaki, C. y Matsuzaki, T. (1995) Crystal structure of *Ustilago sphaerogena* ribonuclease U₂ at 1.8 Å resolution. *Biochemistry* **34**, 15583-15591.
- Noller, H.F., Kop, J., Wheaton, V., Brosius, J., Gutell, R.R., Kopylov, A.M., Dohme, F., Herr, W., Stahl, D.A., Gupta, R. y Woese, C.R. (1981) Secondary structure model for 23S ribosomal RNA. *Nucl. Acids Res.* **9**, 6167-6189.

- Nonaka, T., Nakamura, K.T., Uesugi, S., Ikehara, M., Irie, M. y Mitsui, Y. (1993) Crystal structure of ribonuclease Ms (as a ribonuclease T1 homologue) complexed with a guanydyl-3',5'-cytidine analogue. *Biochemistry* **32**, 11825-11837.
- Oka, T., Natori, Y., Tanaka, S., Tsurugi, K. y Endo, Y. (1990) Complete nucleotide sequence of cDNA for the cytotoxin α -sarcin. *Nucleic Acid Res.* **18**, 1897.
- Oka, T., Aoyama, Y., Natori, Y., Katano, T. y Endo, Y. (1992) An efficient expression system for a variant form of the cytotoxic protein α -sarcin in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1130**, 182-188.
- Oliyai, C. y Borchardt, R.T. (1993) Chemical pathways of peptide degradation. IV. Pathways, kinetics, and mechanism of degradation of an aspartyl residue in a model hexapeptide. *Pharm. Res.* **10**, 95-102.
- Olmo, N., Turnay, J., Lizarbe, M.A. y Gavilanes, J.G. (1993) Cytotoxic effect of α -sarcin, a ribosome-inactivating protein, in cultured *Rugli* cells. *STP Pharma Sci.* **3**, 93-96.
- Olsnes, S. y Pihl, A. (1982) Toxic lectins and related proteins. En *Molecular Action of toxins and viruses*. Cohen, P. y van Heyningen, S., eds. Elsevier Biomedical Press, Nueva York, pp. 51-105.
- Olson, B.H. (1963) Patente US3104204.
- Olson, B.H. y Goerner, G.L. (1965) Alpha-sarcin, a new antitumor agent. I. Isolation, purification, chemical composition, and the identity of a new amino acid. *Applied Microbiol.* **13**, 314-321.
- Olson, B.H., Jennings, J.C., Roga, V., Junek, A.J. y Schuurmans, D.M. (1965) Alpha-sarcin, a new antitumor agent. II. Fermentation and antitumor spectrum. *Applied Microbiol.* **13**, 322-326.
- Olson, B.H. y Goerner, G.L. (1966) Process for the production of mitogillin by *Aspergillus restrictus* and the resulting product. Patente US3230153.
- Oñaderra, M., Gasset, M., Martínez del Pozo, Á., Gavilanes, J.G. (1989) Molecular aspects of α -sarcin penetration in phospholipid bilayers. *Biochem. Soc. Transac.* **17**, 999-1000.
- Oñaderra, M., Mancheño, J.M., Gasset, M., Lacadena, J., Schiavo, G., Martínez del Pozo, Á. y Gavilanes, J.G. (1993) Translocation of α -sarcin across the lipid bilayer of asolectin vesicles. *Biochem.* **295**, 221-225.
- Oñaderra, M., Mancheño, J.M., Lacadena, J., De los Ríos, V., Martínez del Pozo, Á. y Gavilanes, J.G. (1998) Oligomerization of the cytotoxin α -sarcin associated to phospholipid membranes. *Mol. Membr. Biol.* **15**, 141-144.
- Opitz, J.G., Ciglic, M.I., Haugg, M., Trautwein-Fritz, K., Raillard, S.A., Jermann, T.A. y Benner, S.A. (1998) Origin of the catalytic activity of bovine seminal ribonuclease against double-stranded DNA. *Biochemistry* **37**, 4023-4033.

- Orlandi, R., Canevari, S., Conde, F.P., Leoni, F., Mezzanzanica, D., Ripamonti, M. y Colnaghi, M.I. (1988) Immunoconjugate generation between the ribosome inactivating protein restrictocin and an anti-human breast carcinoma MAB. *Cancer Immunol. Immunother.* **26**, 114-120.
- Osterman, H.L. y Walz, F.G., Jr. (1978). Subsites and catalytic mechanism of ribonuclease T1. Kinetic studies using GpA, GpC, GpG and GpU as substrates. *Biochemistry* **17**, 4124-4130.
- Otero, M.J. y Carrasco, L. (1986) External ATP permeabilizes transformed cells to macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **134**, 453-460.
- Otero, M.J. y Carrasco, L. (1987) Proteins are cointernalized with virion particles during early infection. *Virology* **160**, 75-80.
- Otero, M.J. y Carrasco, L. (1988) Exogenous phospholipase C permeabilizes mammalian cells to proteins. *Exp. Cell. Res.* **177**, 154-161.
- Pace, C.N. (1990) Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 14-17.
- Pace, C.N., Heinemann, U., Hahn, U. y Saenger, W. (1991) Ribonuclease T1: structure, function and stability. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 343-360.
- Parente, D., Raucci, G., Celano, B., Pacilli, A., Zanoni, I., Canevari, S., Adorate, E., Colnaghe, M.I., Dosio, F., Arpicco, S., Catell, L., Mele, A. y De Santis, R. (1996) Clavin, a type-I ribosome-inactivating protein from *Aspergillus clavatus* IFO 8605 *Eur. J. Biochem.* **239**, 272-280.
- Parente, D., Raucci, G., D'Alatri, L., D'Estais, G., Novelli, S., Pacilli, A., Saccinto, M.P., Mele, A. y De Santis, R. (1998) Overproduction of soluble, extracellular cytotoxin α -sarcin in *Escherichia coli*. *Mol. Biotechnol.* **9**, 99-106.
- Paris, S., Monod, M., Diaquin, M., Lamy, B., Srruda, I.K., Punt, P.J. y Latgé, J.P. (1993) A transformant of *Aspergillus fumigatus* deficient in the antigenic cytotoxin ASPFI. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**, 31-36.
- Pauly, R.P., Rosche, F., Wermann, M., McIntosh, C.H.S., Pederson, R.A. y Demuth, H.U. (1996) Investigation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide-(1-42) and glucagon-like peptide-1-(7-36) degradation *in vitro* by dipeptidyl peptidase IV using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **271**, 23222-23229.
- Pérez Cañadillas, J.M. (1999) Estructura, dinámica y caracterización electrostática de la proteína α -sarcina por resonancia magnética nuclear. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid.
- Pérez-Cañadillas, J.M., Campos-Olivas, R., Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Gavilanes, J.G., Santoro, J., Rico, M. y Bruix, M. (1998) Characterization of pK_a values and titration shifts in the cytotoxic ribonuclease α -sarcin by NMR. Relationship between electrostatic interactions, structure and catalytic function. *Biochemistry* **37**, 15865-15876.

- Pérez-Cañadillas, J.M., Campos-Olivas, R., Santoro, J. Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Gavilanes, J.G., Rico, M. y Bruix, M. (1999) Solution structure of the cytotoxic ribonuclease α -sarcin. Base de datos PDB, número de acceso 1DE3.
- Pérez-Cañadillas, J.M., Santoro, J., Campos-Olivas, R., Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Gavilanes, J.G., Rico, M. y Bruix, M. (2000) MO of a killer: the highly refined solution structure of the cytotoxic ribonuclease α -sarcin reveals the structural requirements for substrate recognition and ribonucleolytic. *Structure*, en revisión.
- Porse, B.T. y Garret, R.A. (1999) Ribosomal mechanics, antibiotics and GTP hydrolysis. *Cell* **97**, 423-426.
- Quaas, R., McKeown, Y., Stanssens, P., Frank, R., Blöcker, R. y Hahn, U. (1988) Expression of the chemically synthesized gene for ribonuclease T1 in *Escherichia coli* using a secretion cloning vector. *Eur. J. Biochem.* **173**, 617-622.
- Quaas, R., Landt, O., Grunert, H.-P., Beineke, M. y Hahn, U. (1989) Indicator plates for rapid detection of ribonuclease T1 secreting *Escherichia coli* clones. *Nucl. Acids Res.* **17**, 3318.
- Raines, R.T. (1998) Ribonuclease A. *Chem. Rev.* **98**, 1045-1066.
- Rao, A.G., Rood, T., Maddox, J. y Duvick, J. (1992) Synthesis and characterization of defensin NP-1. *Int. J. Pep. Protein Res.* **40**, 507-514.
- Rapak, A., Falsnes, P.O. y Olsnes, S. (1997) Retrograde transport of mutant ricin to the endoplasmic reticulum with subsequent translocation to cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3783-3788.
- Rathore, D. y Batra, J.K. (1996) Generation of active immunotoxins containing recombinant restrictocin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **212**, 58-63.
- Rathore, D., Nayak, S.K. y Batra, J.K. (1996) Expression of ribonucleolytic toxin restrictocin in *Escherichia coli*: purification and characterization. *FEBS Lett.* **392**, 259-262.
- Rathore, D. y Batra, J.K. (1997a) Construction, expression and characterization of chimaeric toxins containing the ribonucleolytic toxin restrictocin. *Biochem. J.* **324**, 815-822.
- Rathore, D. y Batra, J.K. (1997b) Cytotoxic activity of ribonucleolytic toxin restrictocin-based chimeric toxins targeted to epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett.* **407**, 275-279.
- Rathore, D., Nayak, S.K. y Batra, J.K. (1997) Overproduction of fungal ribotoxin α -sarcin in *Escherichia coli*: generation of an active immunotoxin. *Gene* **190**, 31-35.
- Real Academia Española (1999) Ortografía de la lengua española. Espasa, Madrid.
- Roberts, G.C.K., Dennis, E.A., Meadows, D.H., Cohen, J.S. y Jardetzky, O. (1969) The mechanism of action of ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **62**, 1151-1158.

- Rockwell, N.C. y Fuller, R.S. (1998) Interplay between S₁ and S₄ subsites in Kex2 protease: Kex2 exhibits dual specificity for the P₄ side chain. *Biochemistry* **37**, 3386-3391.
- Rodríguez, R., López-Otin, Barber, D., Fernández-Luna, J.L., González, G. and Méndez, E. (1982) Amino acid sequence homologies in α -sarcin, restrictocin and mitogillin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **108**, 315-321.
- Roga, V., Hedeman, L.P. y Olson, B.H. (1971) Evaluation of mitogillin (NSC-69529) in the treatment of naturally occurring canine neoplasms. *Cancer Chemotherapy Reports* **55**, 101-113.
- Rogers, D.T., Saville, D. y Bussey, H. (1979) *Saccharomyces cerevisiae* killer expression mutant *kex2* has altered secretory proteins and glycoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **90**, 187-193.
- Romanos, M.A., Clare, J.J., Beesley, K.M., Rayment, F.B., Ballantine, S.P., Makoff, A.J., Dougan, G., Fairweather, N.F. y Charles, I.G. (1991) Recombinant *Bordetella pertussis* pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccine* **9**, 901-906.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. y Clare, J.J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**, 423-488.
- Rosenberg, A.H., Lode, B.N., Chui, D., Lin, S., Dunn, J.J. y Studier, F.W. (1987) Vectors for expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56**, 125-135.
- Rourke, I.J., Johnsen, A.H., Din, N., Petersen, J.G.L. y Rehfeld, J.F. (1997) Heterologous expression of human cholecystokinin in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a lysine-specific endopeptidase in the yeast secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 9720-9727.
- Roux, K.H., Hecker, K.H. (1997) One-step optimization using touchdown and stepdown PCR. *Methods Mol. Biol.* **67**, 39-45.
- Rushizky, G.W., Mozejko, J.H., Rogerson, D.J.Jr. y Sober, H. (1970) Characterization of enzymatic specificity of a ribonuclease from *Ustilago sphaerogena*. *Biochemistry* **9**, 4966-4971.
- Sacco, G., Drickamer, K. y Wool, I.G. (1983) The primary structure of the cytotoxin α -sarcin. *J. Biol. Chem.* **258**, 5811-5818.
- Sadhukan, R., Sen, G.C. y Sen, I. (1996) Synthesis and cleavage-secretion of enzymatically active rabbit angiotensin-converting enzyme in *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.* **271**, 18310-18313.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor (Nueva York).

- Sandvig, K., Garred, O., Prydz, K., Kozlov, J.V., Hansen, S.H. y Van Deurs, B. (1992) Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* **358**, 510-512.
- Sato, S. y Uchida, T. (1975a) The amino acid sequence of ribonuclease U₂ from *Ustilago sphaerogena*. *Biochem. J.* **145**, 353-360.
- Sato, S. y Uchida, T. (1975b) Ethoxyformylation of ribonuclease U₂ from *Ustilago sphaerogena*. *J. Biochem.* **77**, 795-800.
- Sato, S. y Uchida, T. (1975c) The disulfide bridges of ribonuclease U₂ from *Ustilago sphaerogena*. *J. Biochem.* **77**, 1171-1176.
- Sato, S. y Uchida, T. (1975d) On the interaction of ribonuclease U₂ and substrate analogues. *Biochim. Biophys. Acta* **383**, 168-177.
- Schechter, I. y Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157-162.
- Schechter, B., Schechter, I., Ramachandran, J., Conway-Jacob, A. y Sela, M. (1971) The synthesis and circular dichroism of a series of peptides possessing the structure (L-tyrosyl-L-alanyl-L-glutamyl)_n. *Eur. J. Biochem.* **20**, 301-308.
- Schindler, D.G. (1976) Use of protein synthesis inhibitors to study the biochemistry and genetics of the yeast ribosome. Tesis doctoral, University of Wisconsin - Madison (EE.UU.)
- Schindler, D.G. y Davies, J.E. (1977) Specific cleavage of ribosomal RNA caused by alpha-sarcin. *Nucleic Acid Res.* **4**, 1097-1100.
- Seidah, N.G. y Chrétien, M. (1997) Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr. Op. Biotechnol.* **8**, 602-607.
- Serra, B., Reviejo, A.J., Parrado, C. y Pingarrón, J.M. (1999) Graphite-teflon composite bienzyme electrodes for the determination of L-lactate: application to food samples. *Biosens. Bioelectron.* **14**, 505-513.
- Shapiro, A.L., Viñuela, E. y Maizel, J.V., Jr. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **28**, 815-820.
- Shapiro, R., Fett, J.W., Strydom, D.J. y Vallee, B.L. (1986) Isolation and characterization of a human colon carcinoma-secreted enzyme with pancreatic ribonuclease-like activity. *Biochemistry* **29**, 7255-7264.
- Shlyapnikov, S.V., Both, V., Kulikov, V.A., Dementiev, A.A., Sevcik, J. y Zelinka, J. (1986) Amino acid sequence determination of guanyl-specific ribonuclease Sa from *Streptomyces aureofaciens*. *FEBS Lett.* **209**, 335-339.

- Siegel, R.S. y Brierly, R.A. (1989) Methylophilic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentations with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnol. Bioeng.* **34**, 403-404.
- Siegel, R.S., Bukholz, R.G., Thill, G.P. y Wondrack, L.M. (1990) Production of epidermal growth factor in methylophilic yeast cells. Patente internacional WO/10697.
- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensari, S.M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L. y John, V. (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature* **402**, 537-540.
- Smit, J.J.M., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P.J., Groen, A.K., Wagenaar, F., Van Deemter, L., Mol, C.A.A.M., Ottenhof, R., Van der Lugt, N.M.T., Van Roon, M.A., Van der Valk, M.A., Offerhaus, G.J.A., Berns, A.J.M. y Borst, P. (1993) Homozygous disruption of the murine *mdr-2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* **75**, 451-462.
- Smith, J.M., Davies, J.E. y Holden, D.W. (1993) Construction and pathogenicity of *Aspergillus fumigatus* mutants that do not produce the ribotoxin restrictocin. *Mol. Microbiol.* **9**, 1071-1077.
- Smith, J.M., Tang, C.M., Van Noorden, S. y Holden, D.W. (1994) Virulence of *Aspergillus fumigatus* double mutants lacking restrictocin and an alkaline protease in a low-dose model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect. Immun.* **62**, 5247-5254.
- Steiner, D.F., Cunningham, D., Spiegelman, L. y Aten, B. (1967) Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* **157**, 697-699.
- Steyaert, J., Hallegh, K., Wyns, L. y Stanssens, P. (1990) Histidine-40 of ribonuclease T1 acts as base catalyst when the true catalyst base, glutamic acid-58, is replaced by alanine. *Biochemistry* **29**, 9064-9072.
- Steyaert, J. y Wyns, L. (1993) Functional interaction among the His40, Glu58, and His92. Catalysis of ribonuclease T₁ as studied by double and triple mutants. *J. Mol. Biol.* **229**, 770-781.
- Steyaert, J. (1997) A decade of protein engineering on ribonuclease T1. Atomic dissection of the enzyme-substrate interactions. *Eur. J. Biochem.* **247**, 1-11.
- Stirpe, F., Barbieri, L., Batelli, M.G., Soria, M. y Lappi, D.A. (1992) Ribosome-inactivating proteins from plants: Present studies and future prospects. *Biotechnology* **10**, 405-412.
- Stratton, J., Chiruvolu, V. y Meagher, M. (1998) High cell-density fermentation. *Methods Mol. Biol.* **103**, 107-120.

- Suchanek, G., Kreil, G. y Hermodson, M.A. (1978) Amino acid sequence of honeybee prepromelittin synthesized in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 701-704.
- Sylvester, I.D., Roberts, L.M. y Lord, J.M. (1997) Characterization of prokaryotic recombinant *Aspergillus* ribotoxin α -sarcin. *Biochim. Biophys. Acta* **1358**, 53-60.
- Szewczak, A.A., Moore, P.B., Chan, Y.-L. y Wool, I.G. (1993) The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. USA* **90**, 9581-9585.
- Szewczak, A.A. y Moore, P.B. (1995) The sarcin/ricin loop, a modular RNA. *J. Mol. Biol.* **247**, 81-98.
- Takahashi, K. (1970) The structure and function of ribonuclease T₁. IX. Photooxidation of ribonuclease T₁ in the presence of rose bengal. *J. Biochem.* **67**, 833-839.
- Takahashi, K. (1985) A revision and confirmation of the amino acid sequence of ribonuclease T₁. *J. Biochem.* **98**, 815-817.
- Tang, X., Halleck, M.S., Schlegel, R.A. y Williamson, P. (1996) A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* **272**, 1495-1497.
- Tarr, G.E., Beecher, J.F., Bell, M. y McKean, D.J. (1978) Polyquaternary amines prevent peptide loss from sequenator. *Anal. Biochem.* **84**, 622.
- Teeter, M.M., Mazer, J.A. y L'Italien, J.J. (1981) Primary structure of the hydrophobic plant protein crambin. *Biochemistry* **32**, 715-724.
- Thomas, J.M. y Hodes, M.E. (1981) Improved method for ribonuclease zymogram. *Anal. Biochem.* **113**, 343-351.
- Thomas, G., Thorne, B.A., Thomas, L., Allen, R.G., Hruby, D.E., Fuller, R.S. y Thorner, J. (1988) Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science* **241**, 226-230.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994a) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Thompson, J.E., Venegas, F.D. y Raines, R.T. (1994b) Energetics of catalysis by ribonuclease: fate of the 2',3'-cyclic phosphodiester intermediate. *Biochemistry* **33**, 7408-7414.
- Tschopp, J.F., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C.A. y Gingeras, T.R. (1987a) Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* **15**, 1859-1876.
- Tschopp, J.F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W. y Grinna, L. (1987b) High-level expression of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **5**, 1305-1308.

Turnay, J., Olmo, N., Jiménez, J., Lizarbe, M.A. y Gavilanes, J.G. (1993) Kinetic study of the cytotoxic effect of α -sarcin, a ribosome inactivating protein from *A. giganteus*, on tumor cell lines: protein biosynthesis inhibition and cell binding. *Mol. Cell. Biochem.* **122**, 39-47.

Uchida, T., Arima, T. y Egami, F. (1970) Specificity of RNase U₂. *J. Biochem.* **67**, 91-102.

Uchida, T. y Egami, F. (1971) Microbial ribonucleases with special reference to RNases T₁, T₂, N₁, and U₂. En *The enzymes*. Boyer, P.D., ed. Academic Press, Nueva York y Londres, vol. **4**, pp. 205-250.

Uchida, T. y Shibata, Y. (1981) An affinity adsorbent. 5'-adenylate-aminohexyl-Sepharose. I. Purification and properties of two forms of RNase U₂. *J. Biochem.* **90**, 463-471.

Utsugi, T., Schroit, A.J., Connor, J., Bucana, C.D. y Fidler, I.J. (1991) Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res.* **51**, 3062-3066.

Van Damme, J., Van Beeumen, J., Decock, B., Van Snick, J., De Ley, M. y Biliau, A. (1988) Separation and comparison of two monokines with lymphocyte-activating factor activity: IL-1 β and hybridoma growth factor (HGF). *J. Immunol.* **140**, 1534-1541.

Van Deurs, B., Petersen, O.W., Olsnes, S. y Sandvig, K. (1989) The ways of endocytosis. *Int. Rev. Cytol.* **117**, 131-177.

Van Helvoort, A., Smith, A.J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A.H., Borst, P. y Van Meer, G. (1996) MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* **87**, 507-517.

Vassilyev, D.G., Katayanagi, K., Ishikawa, K., Tusjimoto-Hirano, M., Danno, M., Pahler, A., Matsumoto, O., Matsushima, M., Yodhida, H. y Morikawa, K. (1993) Crystal structures of ribonuclease F1 of *Fusarium moniliforme* in its free form and in complex with 2'-GMP. *J. Mol. Biol.* **230**, 979-996.

Vedvick, T., Buckholz, R.G., Engel, M., Urcan, M., Kinney, J., Provow, S., Siegel, R.S. y Thill, G.P. (1991) High-level secretion of biologically active aprotinin from the yeast. *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol.* **7**, 197-201.

Vey, A., Quiot, J.M., Mazet, I. y McCoy, C.W. (1993) Toxicity and pathology of crude broth filtrate produced by *Hirsutiella thompsonii* var *thompsonii* in shake culture. *J. Invertebr. Pathol.* **61**, 131-137.

Vlasak, R., Unger-Ullmann, C., Kreil, G. y Frischauf, A.M. (1983) Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for honeybee prepromelittin. *Eur. J. Biochem.* **135**, 123-126.

Vollebregt, A.W.H., Van Solingen, P. y Bovenberg, R.A.L. (1994) Isolation and characterization of gene *Y* of *Penicillium chrysogenum*: close relation of the gene product to the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. 2nd European Conference on Fungal Genetics. Lunteren, Países Bajos.

- Von Heijne, G. (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* **133**, 17-21.
- Von Heijne, G. (1985) Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.* **184**, 99-105.
- Von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucl. Acids Res.* **14**, 4683-4690.
- Von Heijne, G. y Abrahamsén, L. (1989) Species-specific variation in signal peptide design. *FEBS Lett.* **244**, 439-446.
- Wagner, J.-C. y Wolf, D.H. (1987) Hormone (pheromone) processing enzymes in yeast. The carboxy-terminal processing enzyme of the mating pheromone α -factor, carboxipeptidase yscA, is absent in α -factor maturation-defective *kex1* mutant cells. *FEBS Lett.* **221**, 423-426.
- Wagner, S.L., Siegel, R.S., Vedvick, T.S., Raschke, W.C. y Van Nostrand, W.E. (1992) High-level expression, purification and characterization of the Kunitz-type protease inhibitor domain of protease nexin-2/amyloid β -protein precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1138-1145.
- Wawrzynczak, E.J., Henry, R.V., Cumber, A. J., Parnell, G.D., Derbyshire, E.J. y Ulbrich, N. (1991) Biochemical, cytotoxic and pharmacokinetic properties of an immunotoxin composed of a mouse monoclonal antibody Fib75 and the ribosome-inactivating protein α -sarcin from *Aspergillus giganteus*. *Eur. J. Biochem.* **196**, 203-209.
- Werten, M.W.T., Van den Bosch, T.J., Wind, R.D., Mooibroek, H. y De Wolf, F.A. (1999) High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast* **15**, 1087-1096.
- Wesche, J., Rapak, A. y Olsnes, S. (1999) Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J. Biol. Chem.* **274**, 34443-34449.
- Wickner, R.B. y Leibowitz, M.J. (1976) Two chromosomal genes required for killing expression in killer strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **82**, 429-442.
- Wilcox, G.R., Fogh, R.H. y Norton, R.S. (1993) Refined structure in solution of the sea anemone neurotoxin ShI. *J. Biol. Chem.* **268**, 24707-24719.
- Williamson, P. y Schlegel, R.A. (1994) Back and forth: the regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells. *Mol. Membr. Biol.* **11**, 199-216.
- Wirth, J., Martínez del Pozo, A., Mancheño, J.M., Martínez-Ruiz, A., Lacadena, J., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1997) Sequence determination and molecular characterization of gigantins, a cytotoxic protein produced by the mould *Aspergillus giganteus* IFO 5818. *Arch. Biochem. Biophys.* **343**, 188-193.
- Wnendt, S., Ulbrich, N. y Stahl, U. (1990) Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding the antifungal-protein of *Aspergillus giganteus* and preliminary characterization of the native gene. *Nucl. Acids Res.* **18**, 3987.

- Wnendt, S., Felske-Zech, H., Henze, P.-P.C., Ulbrich, N. y Stahl, U. (1993) Characterization of the gene encoding α -sarcin, a ribosome-inactivating protein secreted by *Aspergillus giganteus*. *Gene* **124**, 239-244.
- Wnendt, S., Ulbrich, N. y Stahl, U. (1994) Molecular cloning, sequence analysis and expression of the gene encoding an antifungal-protein from *Aspergillus giganteus*. *Curr. Genet.* **25**, 519-523.
- Wold, F. (1985) Reactions of the amide side-chains of glutamine and asparagine *in vivo*. *Trends Biochem. Sci.* **10**, 4-6.
- Woody, R.W. (1972) The circular dichroism of aromatic polypeptides: theoretical studies of poly-L-phenylalanine and some para-substituted derivatives. *Biopolymers* **11**, 1149-1171.
- Wool, I.G. (1984) The mechanism of action of the cytotoxic nuclease α -sarcin and its use to analyse ribosome structure. *Trends Biochem. Sci.* **9**, 14-17.
- Wool, I.G., Glück, A. y Endo, Y. (1992) Ribotoxin recognition of ribosomal RNA and a proposal for the mechanism of translocation. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 266-269.
- Wool, I.G. (1996) Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 164-165.
- Wool, I.G. (1997) Structure and mechanism of action of the cytotoxic ribonuclease α -sarcin. En *Ribonucleases: structures and functions*. D'Alessio, G. y Riordan, J.F., eds. Academic Press, pp. 131-162.
- Yamada, M., Azuma, T., Matsuma, T., Iida, H., Suzuki, H., Yamamoto, K., Kohli, Y. y Hori, H. (1994) Secretion of human intracellular aspartic proteinase cathepsin E expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris* and characterization of produced recombinant cathepsin E. *Biochim. Biophys. Acta* **1206**, 279-285.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashler, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., Carter, D.B., Tomasselli, A.G., Parodi, L.A., Heinrikson, R.L. y Gurney, M.E. (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature* **402**, 533-537.
- Yang, R. y Kenealy, W.R. (1992a) Effects of amino terminal extensions and specific mutations on the activity of restrictocin. *J. Biol. Chem.* **267**, 16801-16805.
- Yang, R. y Kenealy, W.R. (1992b) Regulation of restrictocin production in *Aspergillus restrictus*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1421-1427.
- Yasuda, T. e Inoue, Y. (1982) Studies of catalysis by ribonuclease U_2 . Steady-state kinetics for transphosphorylation of oligonucleotide and synthetic substrates. *Biochemistry* **21**, 364-369.
- Yasuda, T., Nadano, D., Tenjo, E., Takeshita, H. y Kishi, K. (1992) The zymogram method for detection of ribonucleases after isoelectric focusing: analysis of multiple forms of human, bovine and microbial enzymes. *Anal. Biochem.* **206**, 172-177.

Yasukawa, T., Kanei-Ishii, C., Mackaura, T., Fujimoto, J., Yamamoto, T. e Ishii, S. (1995) Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **270**, 25328-25331.

Zachowski, A. (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* **294**, 1-14.

Zhou, A., Webb, G., Zhu, X. y Steiner, D.F. (1999) Proteolytic processing in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 20745-20748.

ANEXO

Relación de publicaciones que, hasta la fecha, recogen los resultados presentados en esta Memoria

Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Gasset, M., Patiño, B., Campos-Olivas, R., Vázquez, C., Martínez-Ruiz, A., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1995) Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **324**, 273-281.

Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, Á., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1997) Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1340**, 81-87.

Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, Á., Lacadena, J., Mancheño, J.M., Oñaderra, M., López-Otín, C. y Gavilanes, J.G. (1998) Secretion of recombinant pro- and mature fungal α -sarcin ribotoxin by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: the Lys-Arg motif is required for maturation. *Protein Expr. Purif.* **12**, 315-322.

Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Lacadena, V., Martínez-Ruiz, A., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1998) The cytotoxin α -sarcin behaves as a cyclizing ribonuclease. *FEBS Lett.* **424**, 46-48.

Lacadena, J., Martínez del Pozo, Á., Martínez-Ruiz, A., Pérez-Cañadillas, J.M., Bruix, M., Mancheño, J.M., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1999) Role of histidine-50, glutamic acid-96 and histidine-137 in the ribonucleolytic mechanism of the ribotoxin α -sarcin. *Proteins* **37**, 474-484.

Martínez-Ruiz, A., Martínez del Pozo, Á., Lacadena, J., Oñaderra, M. y Gavilanes, J.G. (1999) Hirsutellin A displays significant homology to microbial extracellular ribonucleases. *J. Invertebr. Pathol.* **74**, 96-97.

Martínez-Ruiz, A., Kao, R., Davies, J. y Martínez del Pozo, Á. (1999) Ribotoxins are a more widespread group of proteins within the filamentous fungi than previously believed. *Toxicon* **37**, 1549-1563.